



Établissement et caractérisation de nouveaux modèles in vitro de barrière hémato-encéphalique : de la recherche fondamentale à la recherche appliquée

Elodie Vandenhoute

► To cite this version:

Elodie Vandenhoute. Établissement et caractérisation de nouveaux modèles in vitro de barrière hémato-encéphalique : de la recherche fondamentale à la recherche appliquée. Neurosciences [q-bio.NC]. Université d'Artois, 2011. Français. NNT : . tel-00683797

HAL Id: tel-00683797

<https://theses.hal.science/tel-00683797>

Submitted on 29 Mar 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ D'ARTOIS

U.F.R des Sciences

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

EN SCIENCES DE LA VIE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ DE LILLE (ED 446)

Présentée par

Élodie VANDENHAUTE

**Établissement et caractérisation de nouveaux modèles *in vitro*
de barrière hémato-encéphalique : de la recherche fondamentale
à la recherche appliquée**

Soutenue le 2 décembre 2011

Composition du jury :

Rapporteurs :

Dr Mária A. DELI

Biological Research Centre, Szeged, Hungary

Pr Luc STOPPINI

HEPIA, Geneva, Switzerland

Examineurs :

Pr Roméo CECHELLI

Université d'Artois, Lens, France

Dr Pilar PRIETO

ECVAM, Ispra, Italy

Dr Ignacio A. ROMERO

The Open University, Milton Keynes, United Kingdom

Directeur de thèse :

Pr Marie-Pierre DEHOUCK Université d'Artois, Lens, France

Table des matières

LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES DOCUMENTS	viii
RÉSUMÉ	ix
ABSTRACT	x
LISTE DES SIGLES	xi
 Introduction	 2
 I Étude bibliographique	 8
 1 La barrière hémato-encéphalique (BHE)	 9
1.1 Les capillaires cérébraux, support anatomique de la BHE	10
1.2 La BHE, une barrière physique	12
1.2.1 Présence de complexes jonctionnels intercellulaires	12
1.2.2 Un transport vésiculaire non spécifique réduit	17
1.3 La BHE, une barrière métabolique	18
1.3.1 Les enzymes	18
1.3.2 Les pompes d'efflux	19
1.4 Perméabilité sélective de la BHE	30
1.4.1 La diffusion passive	31
1.4.2 La diffusion facilitée	31
1.4.3 Le transport de l'eau et des ions	33
1.4.4 La transcytose	36
1.5 Composants cellulaires et acellulaires induisant les propriétés de la BHE	39
1.5.1 Les astrocytes	40

1.5.2	Les péricytes	41
1.5.3	Les neurones	46
1.5.4	La membrane basale des capillaires cérébraux	47
2	Les modèles d'étude de la BHE	48
2.1	Les modèles <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	49
2.1.1	Les méthodes d'études invasives	49
2.1.2	Les méthodes d'études non invasives (techniques d'imagerie)	53
2.2	Les modèles <i>in vitro</i>	57
2.2.1	Les microvaisseaux cérébraux isolés	57
2.2.2	Les modèles cellulaires	57
2.2.3	Les modèles non cellulaires	75
2.3	Les modèles <i>in silico</i>	76
3	Utilisation des modèles <i>in vitro</i> de BHE : de la recherche fondamentale à la recherche appliquée	79
3.1	Compréhension des interactions cellulaires et moléculaires mises en jeu au sein de la BHE	80
3.1.1	Interactions cellules endothéliales - astrocytes	80
3.1.2	Interactions cellules endothéliales - péricytes	84
3.2	Optimisation du passage de molécules à travers la BHE	94
3.2.1	Approches chimiques	95
3.2.2	Approches biologiques	96
3.3	Études du transport de molécules à visée thérapeutique à travers la BHE lors des étapes précoces du processus de découverte des médicaments	101
3.4	Évaluation de la toxicité	102
3.4.1	Détection de la neurotoxicité	102
3.4.2	Modèles <i>in vitro</i> de BHE et détermination de la neurotoxicité	104
3.5	La BHE en tant que cible thérapeutique : implication dans l'étape de validation des cibles pharmacologiques	105
	Conclusion de l'étude bibliographique	109

II	Travaux personnels	110
1	Mise en place et caractérisation de modèles <i>in vitro</i> de BHE intégrant les péricytes . . .	111
1.1	Résultats	112
1.2	Discussion	129
1.2.1	Les péricytes, un type cellulaire méconnu et insaisissable	129
1.2.2	Intégration des péricytes au sein d'un modèle <i>in vitro</i> de BHE	130
2	Mise en place et caractérisation d'un modèle <i>in vitro</i> de BHE adapté au criblage de molécules	134
2.1	Résultats	135
2.2	Discussion	148
III	Discussion générale et conclusion	150
	Importance de l'unité neuro-glio-vasculaire (UNGV) et de la BHE dans le maintien de l'homéostasie cérébrale	151
	Utilisation des modèles <i>in vitro</i> pour l'étude de la BHE en conditions physiologiques et pathologiques	153
	La BHE, une structure limitante pour le traitement des affections cérébrales	156
	Utilisation des modèles <i>in vitro</i> pour l'étude du transport de molécules à travers la BHE	157
	Conclusion	161
IV	Bibliographie	162
	BIBLIOGRAPHIE	163

LISTE DES FIGURES

1	Structure des capillaires cérébraux <i>in vivo</i>	11
2	Modèle des interactions entre les principales protéines des jonctions serrées et adhérentes.	13
3	Structure générale des protéines de la famille <i>ATP-binding cassette</i> (ABC). . . .	20
4	Le modèle d'« ATP switch », d'après Linton et Higgins (2007)	21
5	Structure de la P-glycoprotéine (P-gp) humaine au sein de la membrane plasmique.	23
6	Structure des <i>multi-drug resistance proteins</i> (MRPs) au sein de la membrane plasmique.	25
7	Structure de la <i>breast cancer resistance protein</i> (BCRP) au sein de la membrane plasmique.	28
8	Les différentes voies de transport au travers de l'endothélium de la BHE.	30
9	Les différents systèmes de transport des acides aminés au niveau de la BHE. . .	33
10	Structure générale des aquaporines.	34
11	Le transport ionique à travers la BHE.	35
12	Les vésicules recouvertes de clathrine.	37
13	Les cavéoles.	38
14	Structure des pieds astrocytaires contactant les capillaires cérébraux	40
15	La voie de signalisation <i>Platelet-Derived Growth Factor-B</i> (PDGF-B)/ <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor-β</i> (PDGFR-β) lors de l'angiogenèse.	42
16	Modifications de l'UNGV chez les souris adultes présentant une déficience en péricytes.	43
17	Modèle des interactions cellulaires mises en jeu lors de la formation de la BHE. .	45
18	Les principales techniques d'étude de la pénétration cérébrale de molécules <i>in vivo</i>	52
19	Principe de la tomographie par émission de positrons (TEP).	54
20	Visualisation d'une ouverture de la BHE en imagerie par résonance magnétique (IRM).	56

21	Méthodes d'isolement de cellules endothéliales de microvaisseaux et de capillaires cérébraux.	58
22	Principe des systèmes de culture sur filtre.	65
23	Calcul de la perméabilité de la BHE : détermination du P_e	67
24	Modèle <i>in vitro</i> de BHE basé sur la coculture réunissant cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins et cellules gliales de rats nouveaux-nés, d'après Dehouck <i>et al.</i> (2011).	69
25	Schémas représentant les différentes configurations de culture testées par Nakagawa <i>et al.</i> (2007).	72
26	Coculture cellules endothéliales-tranches organotypiques cérébrales.	74
27	Modèle dynamique de BHE.	75
28	Principe du système <i>parallel artificial membrane permeability assay</i> (PAMPA).	76
29	Relation entre le coefficient de partage octanol/eau et la perméabilité de la BHE.	77
30	Localisation et morphologie des péricytes cérébraux <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	85
31	Contacts péricytes - cellules endothéliales observées <i>in vivo</i>	91
32	Les différentes approches de vectorisation de molécules à travers la BHE.	95
33	Principe des prodrogues.	96
34	Immunoliposome associés à l'anticorps OX-26 ciblant le récepteur de la transferrine.	99
35	Les applications des modèles de BHE lors des processus de découverte et de développement de médicaments.	108
36	Les deux modèles de triculture formés à partir du modèle de coculture de base.	113
37	L'unité neuro-glio-vasculaire.	151
38	Différents facteurs influençant la pénétration cérébrale d'un médicament, sa distribution et son du système nerveux central (SNC).	157

LISTE DES TABLEAUX

1	Nomenclature des gènes codant pour la P-gp chez les Mammifères, d'après Borst et Schinkel (1997)	22
2	Les différentes lignées endothéliales d'origine cérébrale décrites dans la littérature	63

LISTE DES DOCUMENTS

Article 1 : Modelling the neurovascular unit and the blood-brain barrier with the unique function of pericytes	115
Article 2 : Adapting <i>in vitro</i> blood-brain barrier models for use in early-stage drug discovery	137

RÉSUMÉ

La barrière hémato-encéphalique (BHE), localisée au niveau des capillaires cérébraux, est une composante cruciale de l'unité neuro-glio-vasculaire car elle est responsable du maintien de l'homéostasie cérébrale. En limitant l'accès de nombreuses molécules au parenchyme cérébral, cette structure protège efficacement le système nerveux central (SNC) de composés toxiques, mais empêche ainsi de nombreux médicaments d'atteindre leur cible. La difficulté à étudier les caractéristiques et la perméabilité de la BHE *in vivo* a mené les scientifiques à développer différents modèles *in vitro* de BHE. Notre modèle, qui consiste en une coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et de cellules gliales, a été largement caractérisé : il exprime les caractéristiques de la BHE *in vivo* et s'est avéré utile dans l'étude des interactions cellulaires au sein de la BHE en conditions physiologiques et pathologiques.

Le modèle de coculture initialement développé a été complété par l'addition de péricytes cérébraux afin de former des tricultures. En effet, les péricytes apparaissent aujourd'hui comme des acteurs importants de la BHE, mais sont souvent absents des modèles *in vitro*. Réunir les trois principales populations cellulaires formant la BHE (cellules endothéliales, cellules gliales et péricytes cérébraux) semble nécessaire afin de reproduire encore plus finement la configuration retrouvée *in vivo*, dans le but de comprendre les interactions cellulaires ayant cours au sein de la BHE en conditions physiologiques et pathologiques. Sur la base de notre coculture originelle, deux tricultures ont été mises en place : alors que dans la première les péricytes sont cultivés à distance des cellules endothéliales, ces deux types cellulaires sont étroitement associés dans le second. Les deux modèles ont été caractérisés en terme de morphologie et d'expression de marqueurs endothéliaux, de perméabilité paracellulaire et d'expression de pompes d'efflux, démontrant qu'ils représentent tous deux des modèles pertinents de BHE. Ils permettront d'étudier la contribution des péricytes au phénotype de BHE et à sa réponse en conditions pathologiques, prenant en considération la composante glio-vasculaire.

Dans la majorité des cas, l'utilisation des modèles *in vitro* de BHE au cours des processus de découverte de médicaments vise à prédire si de potentielles molécules thérapeutiques à visée cérébrale peuvent atteindre le SNC, permettant leur effet pharmacologique au niveau de leur cible centrale. Cependant, ces modèles ne présentent généralement pas un débit suffisant pour évaluer rapidement la perméabilité du grand nombre de composés générés par l'industrie pharmaceutique lors des étapes précoces de la découverte de médicaments. A partir de notre coculture d'origine, un premier modèle a été développé pour l'adapter au criblage de molécules en réduisant son format (24 puits au lieu de 6 puits) ainsi que son coût, le temps de culture et les besoins techniques associés. Cette procédure comprend toutefois une étape critique de trypsinisation des cellules endothéliales. Nous avons souhaité rendre ce modèle encore plus facile d'utilisation en le fournissant congelé, afin que l'utilisateur final consacre un minimum de temps et de ressources techniques. Toutes ses caractéristiques montrent qu'il constitue un modèle *in vitro* de BHE pertinent et fiable pouvant répondre au besoin de criblage de composés des groupes pharmaceutiques et des petites entreprises de biotechnologie.

Le travail réalisé a permis d'adapter notre modèle de BHE originel à deux problématiques. D'une part, la simplification de la procédure associée à sa mise en place permet de répondre aux besoins de l'industrie pharmaceutique de générer des données de perméabilité à grande échelle, lors des phases précoces de la découverte de médicaments. D'autre part, l'intégration des péricytes cérébraux au sein du modèle permet d'étudier les interactions cellulaires mises en jeu au sein de la composante glio-vasculaire. Ces modèles pourront donc respectivement contribuer au développement de médicaments à visée cérébrale dont la perméabilité à travers la BHE pourra être optimisée, et à l'étude des intercommunications cellulaires mises en jeu au niveau de la BHE en conditions physiologiques et pathologiques.

Mots clés : barrière hémato-encéphalique, criblage, modèles *in vitro*, péricytes, unité glio-vasculaire.

ABSTRACT

The blood-brain barrier (BBB), located at the level of brain capillaries, is a crucial component of the neurogliovascular unit where it is responsible for brain homeostasis maintenance. By limiting the access of molecules to the brain parenchyma, it effectively protects the central nervous system (CNS) from harmful substances, but at the same time represents a major hurdle for potential neuropharmaceuticals to reach their central target. The difficulty to study BBB features and permeability *in vivo* led to the development of different *in vitro* BBB models. Our model, consisting of a coculture of brain capillary endothelial cells and glial cells, has been extensively characterized: it provides a robust model exhibiting *in vivo* BBB characteristics and has proved useful in elucidating the cellular interactions at the level of the BBB in physiological and pathological conditions.

The initially developed coculture model was completed by the addition of brain pericytes to design three-cell culture models. Indeed, pericytes now appear as important actors of BBB formation and maintenance, but are often absent of *in vitro* BBB models. Gathering the three major cell populations forming the BBB – endothelial cells, glial cells and pericytes – seems important to more accurately reproduce *in vivo* configuration, with the aim of understanding cellular interactions in physiological and pathological conditions. On the basis of our original coculture model, two different three-cell culture models were designed: while pericytes were cultured distant from endothelial cells in the first model, both were closely associated in the second one. Both models were characterized in terms of endothelial marker expression and morphology, paracellular permeability and expression of efflux pumps, demonstrating that they provide reliable *in vitro* BBB models. They may be useful in deciphering the contribution of pericytes to the BBB phenotype and in the response of BBB to injury, taking into account the gliovascular component.

In most cases, the intended use of *in vitro* BBB models in drug discovery is to predict whether investigational drugs are likely to achieve relevant CNS exposure to elicit the desired pharmacological effect. However, *in vitro* BBB models usually do not allow high enough throughput to efficiently evaluate the large number of compounds generated by pharmaceutical companies in early drug discovery stages. Adapted from our original co-culture model, a first *in vitro* BBB model has been developed to meet the increasing need for BBB screening solutions, by reducing its format (24-well instead of 6-well format), and limiting time, cost and technical needs. Nevertheless, the associated procedure still required some technical skills to achieve a proper *in vitro* BBB model, related to the critical trypsinization step of endothelial cells. We aimed at making this model even simpler, by providing this model in a frozen format that allows the final user to dedicate minimal time and resource. All tested BBB features attest of the reliability of this new *in vitro* BBB model to support drug discovery in pharmaceutical but also in smaller biotech companies.

The work presented herein aimed at adapting our original coculture model to address different issues. On the one hand, simplifying the associated procedure allows to produce BBB permeability data at a large scale in early drug discovery. On the other hand, integrating pericytes in the model allows to study cellular interactions within the gliovascular component. These models may therefore respectively contribute to the development of neurotherapeutics with improved BBB permeability, and to a better knowledge of cellular intercommunications within the BBB in health and disease.

Keywords: blood-brain barrier, drug discovery, gliovascular unit, *in vitro* models, pericytes, screening

LISTE DES SIGLES

ABC <i>ATP-binding cassette</i>	EPA <i>Environmental Protection Agency</i>
ADP adénosine di-phosphate	FACS <i>fluorescence activated cell sorting</i>
AMP_c adénosine mono-phosphate cyclique	GABA acide γ -amino butyrique
Ang-1 angiopoïétine-1	GDNF <i>glial-derived neurotrophic factor</i>
AQP aquaporine	GFAP <i>glial fibrillary acidic protein</i>
ARN_m acide ribonucléique messager	γ-GT γ -glutamyl transpeptidase
ATP adénosine tri-phosphate	GLUT-1 <i>glucose transporter-1</i>
AVC accident vasculaire cérébral	GMCSF <i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
BCRP <i>breast cancer resistance protein</i>	HDL <i>high density lipoprotein</i>
BCRP <i>breast cancer resistance protein</i>	HMD hexaméthylènediamine
BEI <i>brain efflux index</i>	HMW-MAA <i>high-molecular-weight melanoma-associated antigene</i>
b-FGF <i>basic fibroblast growth factor</i>	HPLC chromatographie liquide haute performance
BHE barrière hémato-encéphalique	HSPG héparane sulfate protéoglycane
BHL barrière hémato-liquidienne	ICAM-1 <i>inter-cellular adhesion molecule-1</i>
BUI <i>brain uptake index</i>	ICAM-1 <i>Inter-Cellular Adhesion Molecule-1</i>
CADASIL <i>cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy</i>	IL interleukine
CD <i>cluster of differentiation</i>	IRM imagerie par résonance magnétique
CMH complexe majeur d'histocompatibilité	JAM <i>junctional adhesion molecule</i>
CMH complexe majeur d'histocompatibilité	LAM <i>leucocyte adhesion molecule</i>
CML cellule musculaire lisse	LAT-1 <i>large neutral amino acid transporter-1</i>
CR <i>complement receptor</i>	LCR liquide céphalo-rachidien
DOPA 3,4-dihydroxyphénylalanine	LDL <i>low density lipoprotein</i>
ECVAM <i>European Center for the Validation of Alternative Methods</i>	LRP <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
EDTA acide éthylène diamine tétracétique	MAGUK <i>membrane-associated guanylate kinase</i>
EGF <i>epidermal growth factor</i>	MAI membrane artificielle immobilisée
EPAA <i>European Partnership for Alternative Approaches to Animal testing</i>	MAO monoamine oxydase

MCT-1 <i>monocarboxylate transporter-1</i>	<i>ceptor-α</i>
MDCK <i>Madin-Darby Canine Kidney</i>	QSAR <i>quantitative structure-activity relation-ship</i>
MDR <i>multidrug resistance</i>	RAGE <i>receptor for advanced glycation end products</i>
MMP <i>matrix metalloproteinase</i>	REACH <i>enRegistrement, Évaluation et Autorisation des produits CHimiques</i>
MRP <i>multi-drug resistance protein</i>	RMN <i>résonance magnétique nucléaire</i>
NBD <i>nucleotide binding domain</i>	RT-PCR <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
NG2 <i>neuron-glia2</i>	SIDA <i>Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis</i>
NGF <i>nerve growth factor</i>	SLC <i>solute carrier</i>
OATP <i>organic anion transporter polypeptides</i>	SNC <i>système nerveux central</i>
OATP <i>organic anion transporting peptide</i>	SSeCKS <i>src-suppressed C-kinase substrate</i>
OAT <i>organic anion transporter</i>	SV40 <i>Simian vacuolating virus 40</i>
OAT <i>organic anion transporter</i>	TEER <i>transendothelial electric resistance</i>
OCDE <i>Organisation de Coopération et de Développement Économiques</i>	TEP <i>tomographie par émission de positrons</i>
OGD <i>oxygen glucode deprivation</i>	TGF-β <i>transforming growth factor-β</i>
OGD <i>oxygen glucose deprivation</i>	TMD <i>transmembrane domain</i>
PAI-1 <i>plasminogen activator inhibitor type-1</i>	tPA <i>tissue plasminogen activator</i>
PAMPA <i>parallel artificial membrane permeability assay</i>	UNGV <i>unité neuro-glio-vasculaire</i>
PDGF-B <i>Platelet-Derived Growth Factor-B</i>	VCAM-1 <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
PDGFR-β <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor-β</i>	VEGF <i>vascular endothelial growth factor</i>
PEG <i>poly-éthylène glycol</i>	vWF <i>von Willebrand factor</i>
PGI2 <i>prostaglandine I2</i>	ZO <i>Zonula Occludens</i>
P-gp <i>P-glycoprotéine</i>	
PPAR-α <i>peroxisome proliferator activated re-</i>	

Introduction

NÉCESSITANT UN MAINTIEN PARFAIT de l'équilibre ionique pour le bon fonctionnement neuronal, le système nerveux central (SNC) requiert des structures régulatrices permettant de concilier ses besoins de stabilité et l'approvisionnement des cellules nerveuses et gliales en nutriments et en oxygène. Deux systèmes biologiques permettent de maintenir un milieu optimal pour le fonctionnement du tissu nerveux : la barrière hémato-liquidienne (BHL) et la barrière hémato-encéphalique (BHE). La première, qui régule les échanges entre le sang et le liquide céphalo-rachidien (LCR), est localisée au niveau des plexus choroïdes et des villosités arachnoïdiennes, assurant respectivement la production et la résorption du LCR. La BHE, d'une surface 5.000 fois plus importante, siège quant à elle au niveau des capillaires cérébraux, et régule les échanges entre le compartiment parenchymateux cérébral et le compartiment sanguin. L'endothélium des capillaires cérébraux constitue la base anatomique de la BHE : ses propriétés restrictives, qui le distinguent des endothélia périphériques, comprennent la présence de jonctions serrées, la rareté du transport vésiculaire et l'absence de fenestrations ainsi que l'expression de pompes d'efflux et d'enzymes, qui limitent le passage paracellulaire et transcellulaire de nombreuses molécules. Cet endothélium aux propriétés sélectives est entouré par les péricytes cérébraux, inclus dans la membrane basale qu'ils partagent avec les cellules endothéliales au sein de la paroi vasculaire. Les capillaires ainsi formés sont gainés par de nombreux prolongements émis par les astrocytes, connus pour participer à l'induction des propriétés de BHE au niveau des cellules endothéliales.

Afin d'étudier cette structure complexe dont l'investigation peut être ardue *in vivo*, les scientifiques ont mis au point différents modèles *in vitro* de BHE. Ces modèles rendent plus aisée l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu en son sein, tout en réduisant le nombre d'animaux nécessaires aux expérimentations. Étant donné le pouvoir inducteur des astrocytes sur les cellules endothéliales, ces modèles incluent souvent ces deux types cellulaires dans des systèmes de coculture ; celui développé par notre laboratoire il y a une vingtaine d'années réunit cellules endothéliales et cellules gliales, et reproduit les propriétés de la BHE *in vivo* (Dehouck *et al.*, 1990). Il a été largement caractérisé et s'est avéré être un modèle de choix pour étudier les caractéristiques de la BHE en conditions physiologiques et pathologiques, telles que l'ischémie cérébrale et l'inflammation.

Jusqu'à récemment la plupart des travaux consacrés à la BHE s'intéressaient donc principalement aux cellules endothéliales et aux astrocytes, alors que peu d'auteurs se sont penchés sur le rôle des péricytes cérébraux au sein de cette structure. Cependant, un nombre croissant d'études *in vivo* et *in*

vitro indiquent qu'ils jouent un rôle important dans la mise en place et le maintien de la BHE. **Dans ce cadre, une partie de notre travail a consisté à étudier les péricytes cérébraux en culture, puis à les inclure au sein de notre modèle *in vitro* de BHE, afin de former des tricultures unissant cellules endothéliales, cellules gliales et péricytes cérébraux, et donc de reproduire plus fidèlement l'organisation de la BHE *in vivo* .**

Notre modèle original de coculture a aussi été décrit comme une alternative intéressante aux investigations menées *in vivo* dans le cadre d'études du transport de médicaments à travers la BHE menées dans l'industrie pharmaceutique. Sa mise en place nécessite cependant l'utilisation de cellules gliales (d'isolement délicat et de culture longue) : ce modèle n'est donc pas adapté aux étapes de criblage à haut débit de molécules lors des phases précoces de la découverte de médicaments. L'industrie pharmaceutique a besoin de modèles *in vitro* de BHE prédictifs, robustes et utilisables à haut débit. **La seconde partie de ce travail a donc été d'optimiser un modèle *in vitro* de BHE qui soit plus facile à manipuler et présentant un débit plus important, sur la base des travaux réalisés précédemment par Culot *et al.* (2008).** La mise en place d'un premier modèle au format réduit, avec un temps de culture moindre et nécessitant un nombre d'animaux plus faible, constituait une première approche dans ce sens. L'étape suivante a été de rendre ce modèle encore plus simple et plus rapide à utiliser en le fournissant prêt-à-l'emploi, permettant à l'utilisateur final de consacrer un minimum de temps et de technique pour obtenir rapidement et à grande échelle des données de perméabilité à travers la BHE. La seconde partie de ce travail s'est inscrit dans cette logique, afin de fournir un modèle alliant fiabilité, robustesse, simplicité et rapidité d'utilisation pour répondre aux besoins de l'industrie pharmaceutique dans ce domaine.

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction du Pr Marie-Pierre DEHOUCQ au sein du Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique (LBHE, EA 2465, Université d'Artois, Faculté des Sciences Jean Perrin, rue Jean Souvraz, SP 18, 62307 LENS cedex) dirigé par le Pr Roméo CECHELLI. Il a été financé par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche.

La première partie de ce manuscrit comprend une étude bibliographique où seront exposées les caractéristiques de la BHE, puis les modèles servant à son étude. Un dernier chapitre exposera les différents contextes d'utilisation des modèles *in vitro* de BHE. Cette partie débouchera sur l'exposé de nos travaux puis se terminera sur une discussion générale incluant les conclusions de l'étude ainsi

que ses perspectives.

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette thèse a été publié et communiqué, oralement et par affiche, lors de congrès nationaux et internationaux.

Les travaux de thèse ont fait l'objet des publications suivantes :

- Modelling the neurovascular unit and the blood-brain barrier with the unique function of pericytes

Elodie Vandenhaute, Lucie Dehouck, Marie-Christine Boucau, Emmanuel Sevin, Rustem Uzbekov, Meryem Tardivel, Fabien Gosselet, Laurence Tilloy, Roméo Cecchelli et Marie-Pierre Dehouck

Current neurovascular research, sous presse

- Adapting *in vitro* blood-brain barrier models for use in early-stage drug discovery

Elodie Vandenhaute, Emmanuel Sevin, Dorothée Hallier-Vanuxeem, Marie-Pierre Dehouck et Roméo Cecchelli

Drug discovery today, sous presse

Les travaux de thèse ont fait l'objet du chapitre de livre suivant :

- Modelling the blood-brain barrier

Marie-Pierre Dehouck, **Elodie Vandenhaute**, Lucie Dehouck, Emmanuel Sevin, Anne-Marie Lenfant, Yannick Delplace, Dorothée Hallier-Vanuxeem, Maxime Culot et Roméo Cecchelli

Cell Culture Techniques, Neuromethods, 2011, Volume 56, pp 145-160 (Editeur : Springer Science, ISBN : 978-1-61779-076-8)

Les communications orales suivantes ont été présentées :

- Rôle des péricytes cérébraux au sein de l'unité neuro-vasculaire : utilisation d'un modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique

Elodie Vandenhautte, Lucie Dehouck, Roméo Cecchelli et Marie-Pierre Dehouck

10^{ème} Journée André Verbert, Colloque annuel des doctorants, Lille, le 15 septembre 2010

- Role of pericytes within the neuro-vascular unit : use of *in vitro* blood-brain barrier models

Elodie Vandenhautte, Lucie Dehouck, Roméo Cecchelli et Marie-Pierre Dehouck

14^{ème} colloque du réseau LARC-Neuroscience, Lille, France, le 29 octobre 2010

- Étude de l'unité neuro-vasculaire à l'aide de modèles *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique : focus sur les péricytes

Elodie Vandenhautte, Lucie Dehouck, Marie-Magdeleine Ruchoux, Roméo Cecchelli et Marie-Pierre Dehouck

Journée scientifique annuelle du pôle DN2M (Dementia in Neurological and Mental Diseases), Lille, France, le 5 Novembre 2010

et Congrès annuel de la Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires (SCMC), Caen, France, du 20 au 21 janvier 2011

Les communications affichées suivantes ont été présentées :

- Porcine brain microvascular pericytes differentially influence blood-brain barrier permeability *in vitro* according to their HAL/RYR1 genotype

Elodie Vandenhautte, Lucie Dehouck, Michel Franck, Roméo Cecchelli, Marie-Magdeleine Ruchoux et Marie-Pierre Dehouck

Neurex/SEISC meeting, Blood-Brain Interfaces, Strasbourg, France, du 24 au 25 avril 2009

- Rôle des péricytes au sein de la barrière sang-cerveau

Elodie Vandenhautte

Doctoriales franco-belges, Mons, Belgique, du 13 au 18 juin 2010 (Poster de vulgarisation)

- Role of pericytes within the neuro-vascular unit : use of *in vitro* blood-brain barrier models
Elodie Vandenhoute, Lucie Dehouck, Roméo Cecchelli et Marie-Pierre Dehouck
13th International Blood-Brain-Barrier Symposium, Zurich, Suisse, du 2 au 4 septembre 2010
International Brain Barriers Society bursary award 2010 (résumés reviewés internationalement)
- *In vitro* BBB modeling : from research to high throughput screening
Dorothee Hallier-Vanuxeem, **Elodie Vandenhoute**, Anaëlle Da Costa et Roméo Cecchelli
Spring meeting of IVTIP (In Vitro Testing Industrial Platform), Monte-Carlo, Monaco, du 26 au 27 avril 2011
- Assessing the free brain/free plasma ratio *in vitro* in early drug discovery
Roméo Cecchelli, Anaëlle Da Costa, Maxime Culot, Dorothee Hallier-Vanuxeem, Emmanuel Sevin, **Elodie Vandenhoute**, Marie-Pierre Dehouck et Stefan Lundquist
New Developments in Cell-Based In-Vitro Testing, Sarrebruck, Allemagne, du 18 au 20 mai 2011
- Modelling the neurovascular unit : characterization of two new blood-brain barrier models including pericytes
Elodie Vandenhoute, Lucie Dehouck, Marie-Christine Boucau, Emmanuel Sevin, Rustem Uzbekov, Meryem Tardivel, Fabien Gosselet, Laurence Fenart, Roméo Cecchelli et Marie-Pierre Dehouck
9th International Cerebral Vascular Biology meeting, Leiden, Pays-Bas, du 21 au 25 juin 2011
Prix poster lors de la session « *Development, differentiation and ageing of the blood-brain barrier* »
- Transient opening of the blood-brain barrier during an *in vitro* ischemia/reperfusion study
Mélanie Kuntz, Caroline Mysiorek, Olivier Pétrault, **Elodie Vandenhoute**, Rustem Uzbekov, Régis Bordet, Marie-Pierre Dehouck, Roméo Cecchelli et Vincent Berezowski
9th International Cerebral Vascular Biology meeting, Leiden, Pays-Bas, du 21 au 25 juin 2011

- Oxysterols, blood-brain barrier and cholesterol homeostasis

Julien Saint-Pol, **Elodie Vandenhoute**, Marie-Christine Boucau, Lucie Dehouck, Roméo Cecchelli, Marie-Pierre Dehouck, Laurence Tilloy et Fabien Gosselet

International Conference on Alzheimer's Disease 2011, Paris, France, du 16 au 21 juin 2011

Première partie

Étude bibliographique

La barrière hémato-encéphalique (BHE)

Sommaire

1.1	Les capillaires cérébraux, support anatomique de la BHE	10
1.2	La BHE, une barrière physique	12
1.2.1	Présence de complexes jonctionnels intercellulaires	12
1.2.2	Un transport vésiculaire non spécifique réduit	17
1.3	La BHE, une barrière métabolique	18
1.3.1	Les enzymes	18
1.3.2	Les pompes d'efflux	19
1.4	Perméabilité sélective de la BHE	30
1.4.1	La diffusion passive	31
1.4.2	La diffusion facilitée	31
1.4.3	Le transport de l'eau et des ions	33
1.4.4	La transcytose	36
1.5	Composants cellulaires et acellulaires induisant les propriétés de la BHE	39
1.5.1	Les astrocytes	40
1.5.2	Les péricytes	41
1.5.3	Les neurones	46
1.5.4	La membrane basale des capillaires cérébraux	47

LE CONCEPT de barrière hémato-encéphalique (BHE) a aujourd'hui plus d'un siècle puisque la première expérience démontrant son existence fut réalisée en 1885 par Paul Ehrlich. Ce physiologiste avait injecté un colorant vital dans la circulation de souris, lequel avait diffusé dans l'ensemble des organes excepté le cerveau (Ehrlich, 1885). Cette observation avait d'abord été interprétée comme résultant d'une faible affinité du colorant pour le tissu cérébral. Mais quelques années plus tard, en 1913, son étudiant Edwin Goldmann démontra que ce n'était pas le cas puisque l'injection de colorant dans le liquide céphalo-rachidien avait non seulement teinté l'ensemble du cerveau mais en plus n'avait pas diffusé vers le système périphérique (Goldmann, 1913). Ce résultat démontrait alors l'existence d'une barrière entre le sang et le cerveau limitant la diffusion entre ces deux compartiments. Le terme de « BHE » n'apparaît qu'un peu plus tard dans la littérature francophone (Stern, 1921) et sa localisation au niveau des capillaires cérébraux a été établie lorsque les jonctions serrées ont été observées entre les cellules endothéliales de ces capillaires (Reese et Karnovsky, 1967). Cette barrière est maintenant connue comme une interface dynamique dont le rôle de filtre sélectif vise à maintenir l'homéostasie cérébrale nécessaire au bon fonctionnement des neurones et des cellules gliales. Le phénotype particulier de ces cellules endothéliales se développe notamment sous l'influence des astrocytes du tissu glial. Et bien qu'aujourd'hui l'endothélium des capillaires cérébraux demeure le site anatomique de la BHE, ses interactions avec les éléments périvasculaires s'étendent jusqu'aux neurones et affichent une complexité croissante, qui a récemment mené au concept que l'ensemble de ces cellules vasculaires et nerveuses forment une unité fonctionnelle : l'unité neuro-glio-vasculaire (UNGV).

1.1 Les capillaires cérébraux, support anatomique de la BHE

Les capillaires cérébraux sont constitués d'une monocouche de cellules endothéliales jointives reposant sur une membrane basale continue, dans laquelle se trouve enchâssés les péricytes. Ces capillaires sont entourés d'un manchon ininterrompu de pieds astrocytaires (Figure 1). De la lumière du capillaire vers la périphérie, on trouve :

- les **cellules endothéliales**, définies depuis les années 60 par Reese et Karnovsky (1967) comme le siège anatomique de la BHE. Elles présentent des caractéristiques structurales et métaboliques qui différencient l'endothélium des capillaires cérébraux de celui des autres organes. En particulier ces cellules sont polarisées, présentent des jonctions intercellulaires spécifiques et sont extrêmement riches en mitochondries (qui représentent jusqu'à 10% du volume cel-

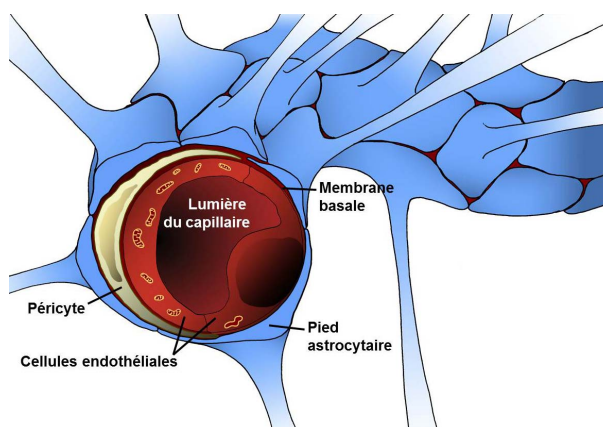


Figure 1 – **Structure des capillaires cérébraux *in vivo***. Modifié de Delorme *et al.* (1968). Les cellules endothéliales, intimement liées aux péricytes avec lesquels elles partagent une membrane basale commune, délimitent la face interne des capillaires cérébraux. Les astrocytes émettent de nombreux prolongements, les pieds astrocytaires, formant un manchon continu autour des capillaires cérébraux.

lulaire, contre 2 à 5% dans les cellules endothéliales périphériques) (Oldendorf *et al.*, 1977). Cette abondance de mitochondries assure la production de la grande quantité d'énergie nécessaire au maintien des caractéristiques structurales et de l'activité métabolique intense de ces cellules (Nag, 2003). Les cellules endothéliales cérébrales se caractérisent également par une faible densité de vésicules endocytiques et pinocytiques (Begley et Brightman, 2003) et par l'absence de canaux transendothéliaux (Reese et Karnovsky, 1967). L'ensemble de leurs propriétés concourt à restreindre les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral.

- la **membrane basale**, servant de support aux cellules endothéliales. Elle est produite par les cellules endothéliales elles-mêmes et par les péricytes qui y sont inclus. Elle est composée essentiellement de collagène de type IV, de laminine et de fibronectine. Elle présente également des charges anioniques portées, d'une part, par des protéoglycanes riches en héparanes sulfates et d'autre part, par des glycoprotéines riches en acides sialiques. La structure en réseau tridimensionnel du collagène et la présence de charges anioniques font de cette structure un filtre sélectif. En plus de ce rôle structural, des expériences réalisées *in vitro* ont montré que l'interaction des cellules avec la membrane basale est importante pour le maintien de leur phénotype (Tilling *et al.*, 1998). La dégradation de la membrane basale sous l'effet de métalloprotéases ou de collagénases est fréquemment impliquée dans les manifestations pathologiques à l'origine de la rupture de la BHE (Gasche *et al.*, 2006).
- les **péricytes**, enchâssés au sein de la membrane basale. Ils présentent de nombreux prolongements qui encerclent les cellules endothéliales ; au niveau des capillaires cérébraux, le ratio

péricytes-cellule endothéliales est estimé à 1 pour 3, et la distance qui sépare ces deux types cellulaires à seulement 20 nm (Allt et Lawrenson, 2001; Bonkowski *et al.*, 2011). Alors que ce type cellulaire a longtemps été négligé dans l'étude de la physiopathologie de la BHE, des découvertes récentes démontrent que ce type cellulaire joue un rôle majeur dans la mise en place et le maintien des propriétés de la BHE (Armulik *et al.*, 2011).

- les **pieds astrocytaires**, qui occupent plus de 85% de la surface des capillaires, formant un manchon quasi-continu le long de ces vaisseaux (Fenstermacher *et al.*, 1988). Ces prolongements astrocytaires forment entre eux des jonctions lacunaires (jonctions « *gap* ») et des desmosomes (Nakazawa et Ishikawa, 1998). La proximité de ces pieds astrocytaires avec les cellules endothéliales suggère l'existence d'une communication spécifique entre ces deux types cellulaires. En effet, l'influence des astrocytes sur la différenciation des cellules endothéliales ainsi que sur la modulation de la perméabilité de la BHE ont été largement démontrées et discutées (Abbott, 2002; Abbott *et al.*, 2010).

L'ensemble de ces éléments (cellules endothéliales, membrane basale, péricytes et pieds astrocytaires) contribue à faire des capillaires cérébraux une barrière à la fois physique et métabolique qui régule les échanges entre le sang et le SNC, assurant le maintien de l'homéostasie cérébrale. Les propriétés structurales et métaboliques de la BHE font l'objet des sections suivantes.

1.2 La BHE, une barrière physique

1.2.1 Présence de complexes jonctionnels intercellulaires

L'espace interendothélial de la BHE se caractérise par la présence d'un complexe jonctionnel comprenant des jonctions adhérentes et des jonctions serrées, qui se succèdent dans un ordre précis à partir de la lumière du capillaire. Le rôle de ce complexe ne se résume pas à restreindre le passage paracellulaire de solutés (Bazzoni et Dejana, 2004); il intervient également dans la polarisation des cellules endothéliales, en limitant la diffusion des lipides et des protéines entre les membranes apicales et basolatérales. La formation de ces complexes inclut l'interaction entre des protéines transmembranaires et cytosoliques reliées entre elles ainsi qu'au réseau d'actine intracellulaire (Figure 2) (Hawkins et Davis, 2005; Huber *et al.*, 2001; Wolburg et Lippoldt, 2002; Wolburg *et al.*, 1994). Ces jonctions interviennent aussi dans le transfert de signaux intracellulaires et dans d'autres fonctions cellulaires comme la croissance, l'apoptose et la réorganisation du cytosquelette (Dejana, 2004).

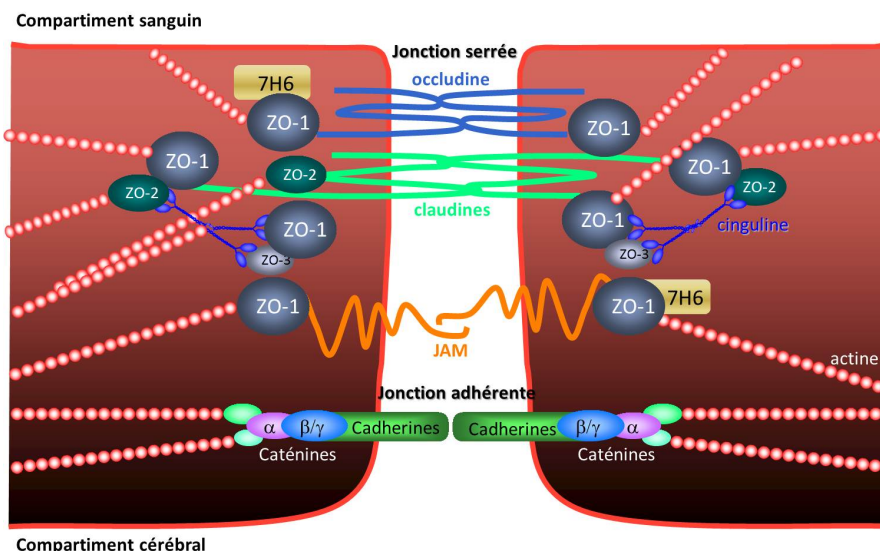


Figure 2 – **Modèle simplifié des interactions entre les principales protéines formant les jonctions serrées et adhérentes.** Modifié de Abbott *et al.* (2010). Les *claudines* et l'*occludine* forment le squelette des **jonctions serrées** en se dimérisant de façon homophile avec leurs homologues de la cellule adjacente. Les jonctions serrées comprennent également des protéines cytoplasmiques : les *protéines Zonula Occludens* (ZO-1, 2 et 3) qui servent de protéines de reconnaissance pour le placement des jonctions serrées et sont aussi des protéines impliquées dans les phénomènes de transduction du signal. La protéine *7H6* est colocalisée avec ces jonctions. La *cinguline* est une protéine de type myosine double brin qui se lie préférentiellement à ZO-1 par sa partie globulaire. L'*actine* possède des sites de liaison sur les ZOs, l'occludine et les claudines. La jonction serrée repose sur une zone de contact intercellulaire, constituée par des molécules d'adhésion telles que les *junctional adhesion molecules* (JAMs), ainsi que sur la présence de **jonctions adhérentes**, formées par les *cadhérines* et les *caténines*.

1.2.1.1 Les jonctions adhérentes

Présentes de manière ubiquitaire le long de l'arbre vasculaire, les jonctions adhérentes remplissent de nombreuses fonctions : l'initiation et la stabilisation de l'adhésion cellule-cellule, la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine et la régulation de la signalisation intracellulaire. Elles représentent un premier contact entre les cellules endothéliales adjacentes, préalablement nécessaire à la formation des jonctions serrées et à l'initiation de la polarisation cellulaire (Bazzoni et Dejana, 2004). Deux types de protéines les composent :

- les **cadhérines**. Ces glycoprotéines possédant un seul domaine transmembranaire interagissent de façon homotypique en présence de calcium pour permettre l'adhésion de cellules adjacentes. Les cellules endothéliales expriment la cadhérine-5, encore appelée la *vascular endothelial* (VE)-cadhérine (Dejana *et al.*, 1995). Cette VE-cadhérine est exprimée par les cellules endothéliales de l'ensemble du système vasculaire. Elle se lie *via* son extrémité carboxy-terminale cytoplasmique aux caténines, et joue un rôle important dans la stabilisation des jon-

tions (Vestweber *et al.*, 2009).

- les **caténines**. Elles représentent le lien permettant la communication entre les jonctions serrées et les jonctions adhérentes, mais également entre le complexe jonctionnel et le cytosquelette d'actine. Au niveau de la BHE, les β - et γ -caténines relient les jonctions adhérentes à l'actine.

1.2.1.2 Les jonctions serrées

Les jonctions serrées (ou étanches) se composent de protéines transmembranaires et cytoplasmiques (Furuse, 2010). L'association de ces protéines entre elles et à l'actine du cytosquelette permet la formation d'un complexe jonctionnel scellant efficacement les espaces intercellulaires. Parmi les protéines transmembranaires ;

- l'**occludine** fut la première protéine transmembranaire des jonctions serrées à être décrite (Furuse *et al.*, 1993). Cette protéine de 65 kDa voit sa localisation cellulaire directement liée à son degré de phosphorylation : les formes les moins phosphorylées seront localisées au niveau de la membrane basolatérale, du cytoplasme et des jonctions serrées, alors que la forme la plus phosphorylée se concentrera uniquement au niveau de ces dernières (Sakakibara *et al.*, 1997). Même si sa présence au sein des jonctions serrées de la BHE est corrélée à une augmentation de la résistance transendothéliale et à une diminution de la perméabilité paracellulaire (Hirase *et al.*, 1997), elle ne semble pas primordiale à leur mise en place puisque des souris déficientes en occludine présentent une organisation normale des jonctions serrées (Saitou *et al.*, 2000). L'occludine interviendrait donc dans la régulation de ces dernières plutôt que dans l'établissement proprement dit des propriétés de barrière.
- les **claudines**, qui forment une famille dont 24 membres ont été identifiés jusqu'à présent, ont des poids moléculaires allant de 21 à 28 kDa (Furuse, 2010). Elles présentent 4 domaines transmembranaires qui portent à leur extrémité carboxy-terminale un domaine homologue extrêmement conservé (Kennedy, 1995) qui leur permet d'interagir avec plusieurs protéines cytoplasmiques telles que les *Zonula Occludens*-1, 2 et 3 (Itoh et Bissell, 2003). Les claudines forment des dimères avec leurs homologues de la cellule adjacente, permettant une adhésion entre les deux membranes plus forte que celle produite par l'occludine (Huber *et al.*, 2001; Kubota *et al.*, 1999). Les claudines sont des protéines spécifiques des jonctions serrées (Morita *et al.*, 2005). Au niveau des cellules endothéliales de la BHE mammifère sont exprimées

les claudines-3, 5, et 12 avec une expression majoritaire de la claudine-5 (Lippoldt *et al.*, 2000; Wolburg et Lippoldt, 2002). Les souris déficientes en claudine-5 se caractérisent par une augmentation sélective de la perméabilité de la BHE aux petites molécules (<800 Da), démontrant le rôle de cette protéine dans la restriction du passage paracellulaire (Nitta *et al.*, 2003). La présence de la claudine-1 au niveau de la BHE reste encore controversée ; les claudines-10 et 22 ont été récemment mises en évidence dans des cellules endothéliales de capillaires cérébraux de souris (Ohtsuki *et al.*, 2008).

- les **junctional adhesion molecules** (JAMs) appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Elles peuvent former des interactions homo- ou hétérodimériques entre elles, de part et d'autre des membranes de deux cellules adjacentes (Wolburg et Lippoldt, 2002). Ce sont de petites protéines (40 kDa) capables de se lier aux protéines ZO-1, cinguline, et occludine (Bazzoni *et al.*, 2000). Les jonctions intercellulaires qu'elles forment réduisent la perméabilité paracellulaire (Martin-Padura *et al.*, 1998) et jouent un rôle important dans la formation des jonctions serrées et dans l'acquisition de la polarité cellulaire (Ebnet *et al.*, 2004).

En plus des trois protéines transmembranaires qui viennent d'être décrites, des protéines cytoplasmiques offrent un support structurel aux jonctions étanches en permettant leur organisation et leur connexion avec le cytosquelette d'actine :

- les **protéines Zonula Occludens** (ZO-1, 2 et 3) sont des guanylate kinases associées à la membrane ou *membrane-associated guanylate kinase* (MAGUK) (González-Mariscal *et al.*, 2003). Parmi elles, ZO-1 (220 kDa) fut la première à être identifiée par Stevenson *et al.* (1986). Sa présence au sein du complexe protéique des jonctions serrées est importante puisqu'en son absence, la perméabilité endothéliale est augmentée (Abbruscato *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2002; Mark et Davis, 2002). ZO-1 joue également le rôle de molécule de signalisation, puisqu'elle est capable de se délocaliser dans le noyau dans des conditions de stress et de prolifération (Gottardi *et al.*, 1996). ZO-2 (160 kDa) et ZO-3 (130 kDa) furent identifiées plus tard grâce à leur coprécipitation avec ZO-1 à partir d'extraits d'épithélia en culture (Gumbiner *et al.*, 1991; Haskins *et al.*, 1998). La fonction de ZO-2, qui possède une structure identique à celle de ZO-1, est encore incertaine mais elle semble compenser l'absence de ZO-1 et faciliter la formation des jonctions serrées morphologiquement normales dans des cultures dépourvues de ZO-1 (Umeda *et al.*, 2004). La protéine ZO-3 qui présente des homologies de séquence avec

ses deux consœurs, interagit directement avec ZO-1, la cinguline et l'occludine mais pas avec ZO-2 (Haskins *et al.*, 1998), mais son rôle au sein des jonctions étanches n'a pas encore été identifié.

- la **protéine 7H6** doit son nom à l'anticorps monoclonal ayant permis son isolement par Zhong *et al.* (1993). Cette phosphoprotéine, dont le poids moléculaire varie entre 155 kDa et 175 kDa selon l'espèce considérée, joue un rôle majeur dans l'assemblage et la régulation des jonctions serrées au sein des cellules épithéliales et des cellules endothéliales de la BHE, *via* une interaction directe avec ZO-1 (Satoh *et al.*, 1996). La protéine 7H6 ne se localise au voisinage des jonctions serrées que si elle est phosphorylée (Zhong *et al.*, 1993). Jusqu'à présent aucune étude n'a démontré la présence de cette protéine au sein de tissus dépourvus de ces mêmes jonctions (Satoh *et al.*, 1996).
- la **cinguline** est un dipeptide (140 kDa) qui se localise face cytoplasmique des jonctions serrées, comme démontré par Stevenson *et al.* (1989). Elle est capable d'interagir avec ZO-1, ZO-2 et les JAMS *via* son extrémité aminoterminal, et avec ZO-3 et la myosine *via* ses extrémités amino- et carboxy-terminales (Cordenonsi *et al.*, 1999). La cinguline aurait un rôle dans la transduction de la force mécanique générée par la contraction de l'actine et de la myosine à laquelle elle est connectée, influençant la perméabilité au niveau paracellulaire (Bauer *et al.*, 2004; Cordenonsi *et al.*, 1999).
- la **protéine AHNK** est une phosphoprotéine dite « géante » du fait de son haut poids moléculaire (700 kDa). Elle migre du cytoplasme vers la membrane plasmique lors de la mise en place des contacts intercellulaires au sein des épithélia (Sussman *et al.*, 2001), mais son rôle exact n'est pas clairement défini. Une étude réalisée en collaboration avec notre laboratoire a démontré son expression dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, où elle est associée à ZO-1 (Gentil *et al.*, 2005).

Enfin, l'**actine**, bien qu'elle ne soit pas définie comme une protéine des jonctions serrées, intervient dans la mise en place et le maintien du complexe jonctionnel. La forme globulaire de l'actine polymérise sous forme de filaments (l'actine-F), dont la dynamique donne au cytosquelette l'infrastructure nécessaire au maintien de la morphologie cellulaire.

Rubin *et al.* (1991) ont étudié l'organisation de l'actine filamenteuse marquée à la rhodamine-phalloïdine au niveau de cellules endothéliales en culture : l'augmentation de la résistance électrique est associée à la redistribution de la F-actine. En l'absence de jonctions serrées, l'actine filamenteuse est diffuse et répartie dans tout le cytoplasme de la cellule endothéliale. À l'inverse, lorsque les cellules endothéliales présentent des jonctions serrées, la F-actine est localisée principalement au niveau de la membrane plasmique et le marquage au niveau du cytoplasme est nettement atténué. L'actine est capable de se lier aux protéines ZO, à la claudine et à l'occludine (Itoh *et al.*, 1999), et joue un rôle important dans la modulation de la perméabilité de la BHE en conditions physiologiques et pathologiques (Lai *et al.*, 2005).

L'ensemble des protéines précédemment citées interagit efficacement pour restreindre l'espace intercellulaire, mais les jonctions serrées de la BHE ont d'autres rôles. Loin de former des ensembles statiques, ces structures hautement dynamiques sont finement régulées par l'environnement cérébral (Wolburg *et al.*, 2009), constituant des complexes de signalisation hétéromériques qui permettent le contrôle de l'expression de gènes, la prolifération et la différenciation cellulaire (González-Mariscal *et al.*, 2008). La signalisation au niveau des jonctions serrées est bidirectionnelle : elles reçoivent des signaux intracellulaires régulant leur assemblage et leur fonction, et elles transmettent des informations en retour vers l'intérieur de la cellule pour réguler l'expression de gènes et les réponses cellulaires subséquentes (Terry *et al.*, 2010).

1.2.2 Un transport vésiculaire non spécifique réduit

1.2.2.1 Les vésicules

Les vésicules se répartissent entre les faces apicale et basolatérale des cellules endothéliales de la BHE. Elles se déplacent ainsi entre la face luminale et la face abluminale, participant au transport des molécules du sang au parenchyme cérébral ou *vice versa*. Ces vésicules participent donc au transport de type « *fluid-phase* », qui permet le passage non spécifique de molécules du sang vers les tissus (Bruns et Palade, 1968). Au niveau de la BHE, le nombre de vésicules reste très limité en conditions physiologiques, réduisant le transport non spécifique de substances entre les compartiments sanguin et cérébral (Brightman et Reese, 1969; Joó, 1971).

1.2.2.2 Les canaux transendothéliaux

Des canaux transendothéliaux peuvent se former à partir de la fusion de plusieurs vésicules (Simionescu *et al.*, 1975) qui permettraient, comme les vésicules, le transport non spécifique de molécules par « *fluid-phase* ». Cependant, ces structures sont inexistantes au niveau de la BHE en conditions physiologiques (Balin *et al.*, 1987).

Outre la présence de structures jonctionnelles complexes et la rareté du transport vésiculaire non spécifique, les cellules endothéliales de la BHE présentent d'autres caractéristiques - métaboliques - qui elles aussi restreignent le passage de molécules du compartiment sanguin au compartiment cérébral.

1.3 La BHE, une barrière métabolique

Les cellules endothéliales de la BHE expriment des pompes d'efflux et des enzymes particulières qui limitent le passage de nombreux composés du compartiment sanguin au compartiment cérébral. Ces enzymes et pompes d'efflux participent ainsi à ce que Betz *et al.* (1980) ont défini comme la « barrière métabolique ».

1.3.1 Les enzymes

1.3.1.1 Les monoamine oxydases (MAOs)

Les monoamine oxydases (MAO-A et MAO-B) sont des enzymes mitochondriales présentes au niveau des tissus cérébraux (Lai *et al.*, 1975), la MAO-A étant présente au niveau de l'endothélium cérébral (Konradi *et al.*, 1987). Elles dégradent les neurotransmetteurs monoaminergiques (dopamine, sérotonine, noradrénaline, adrénaline) libérés par les neurones et empêchent également le passage de leurs précurseurs (5-hydroxytryptophane et 3,4-dihydroxyphénylalanine) du sang vers le cerveau (Lai *et al.*, 1975).

1.3.1.2 La γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT)

La γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) représente l'enzyme la plus caractéristique des cellules endothéliales de la BHE (Meyer *et al.*, 1990). Elle est également présente et fonctionnelle au niveau des péricytes (Frey *et al.*, 1991), qui représentent la source majeure de cette enzyme au niveau des

capillaires cérébraux (Risau *et al.*, 1992). Son activité permet de catalyser le transfert de résidus γ -glutamyl d'un peptide donneur (essentiellement le glutathion) à un peptide accepteur. Elle est associée au transport de certains acides aminés à travers la BHE. Par ailleurs, elle a été décrite comme étant neuroprotectrice car son activité enzymatique permet de lutter contre l'invasion cérébrale des leucotriènes C4. Ainsi, elle contribue au maintien d'une faible perméabilité de la BHE (Black *et al.*, 1994).

1.3.1.3 La phosphatase alcaline

Cette enzyme hydrolyse les métabolites phosphorylés et contrôle le transport d'esters de phosphate et d'ions phosphate (Meyer *et al.*, 1990). Elle est particulièrement abondante au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Lawrenson *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 1990).

1.3.1.4 Les enzymes de détoxification

D'autres enzymes telles que les cytochrome P450 monooxygénases, les NADPH-cytochrome P450 réductases, les glucosyl transférases, les glutathion peroxydases et les époxyde hydrolases participent à la fonction de détoxification de la BHE (Gherzi-Egea *et al.*, 1995). Ces enzymes - qui sont surtout exprimées au niveau des plexus choroïdes - sont responsables au niveau de la BHE de la dégradation de certains xénobiotiques.

Outre les enzymes sus-citées, l'endothélium de la BHE présente un degré supplémentaire de protection de l'environnement cérébral grâce à l'expression de transporteurs d'efflux membranaires. Enzymes et pompes d'efflux agissent donc de concert pour limiter la pénétration cérébrale de nombreux composés (Declèves *et al.*, 2011).

1.3.2 Les pompes d'efflux

Les transporteurs d'efflux membranaires sont des protéines participant au transport actif de molécules endogènes ou exogènes. Ils assurent la protection et la détoxification du SNC en limitant l'entrée ou en facilitant la sortie des molécules potentiellement toxiques au niveau cérébral (Cordon-Cardo *et al.*, 1989). Ils comprennent plusieurs familles et sous-familles, dont la plus importante est la famille des transporteurs ATP-binding cassette (ABC), représentée par les protéines *multidrug resistance* (MDR), la *breast cancer resistance protein* (BCRP) et les *multi-drug resistance proteins* (MRPs)

au niveau de la BHE. Leurs activités combinées réduisent la pénétration cérébrale de nombreux médicaments (Begley, 2004).

1.3.2.1 Les transporteurs de la famille ABC

Chez l'Homme les gènes codant pour les transporteurs ABC sont au nombre de 49, regroupés dans sept sous-familles, de ABCA à ABCG selon l'organisation de leurs domaines et l'homologie de leurs acides aminés (Vasiliou *et al.*, 2009). Ces pompes utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'adénosine tri-phosphate (ATP) pour déplacer leurs substrats à travers les membranes, vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule (ou de vésicules intracellulaires) contre leur gradient électrochimique. La majorité des gènes de la famille ABC codent pour des protéines membranaires, participant au transport d'une grande variété de molécules. Les protéines ABC sont structurellement constituées de quatre domaines principaux (Figure 3) (Vasiliou *et al.*, 2009) :

- deux domaines cytosoliques de liaison à l'ATP appelés *nucleotide binding domains* (NBDs), au niveau desquels a lieu l'hydrolyse de l'ATP nécessaire au transport de la molécule-substrat.
- deux domaines transmembranaires appelés *transmembrane domains* (TMDs), chaque TMD comportant 4 à 6 hélices α transmembranaires. Les deux TMDs ainsi constitués forment le pore par lequel transite la molécule transportée, et assurent la spécificité de la protéine ABC pour ses substrats. C'est pourquoi ces TMDs varient fortement d'une protéine ABC à une autre.

Outre ces domaines principaux, des domaines optionnels peuvent s'ajouter à la structure de base, tels que des domaines régulateurs et/ou un domaine transmembranaire supplémentaire (Figure 3).

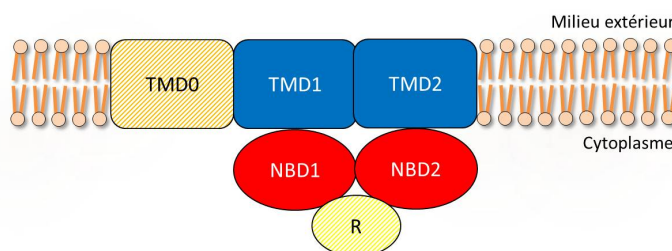


Figure 3 – **Structure générale des protéines de la famille ABC.** Modifié de Vautier *et al.* (2006). Les protéines ABC sont formées de deux domaines transmembranaires principaux (TMD1 et TMD2) formant le pore sélectif du transporteur, et de deux domaines cytosoliques (NBD1 et NBD2) qui catalysent l'hydrolyse de l'ATP nécessaire au processus de transport actif du substrat. En plus de ces 4 domaines, il peut aussi exister un troisième domaine transmembranaire (TMD0) et un domaine régulateur (noté R) optionnels.

Les transporteurs ABC sont fonctionnels sous forme de monomères, d'homodimères, d'hétérodimères ou de polymères. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer les mécanismes de transport des protéines ABC ; le modèle le plus couramment admis décrit un mécanisme d'« ATP switch » (Higgins et Linton, 2004). Il consiste en un processus en 4 étapes faisant intervenir une communication à double sens entre les NBDs et les TMDs, *via* un changement conformationnel provoqué grâce à la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (Figure 4).

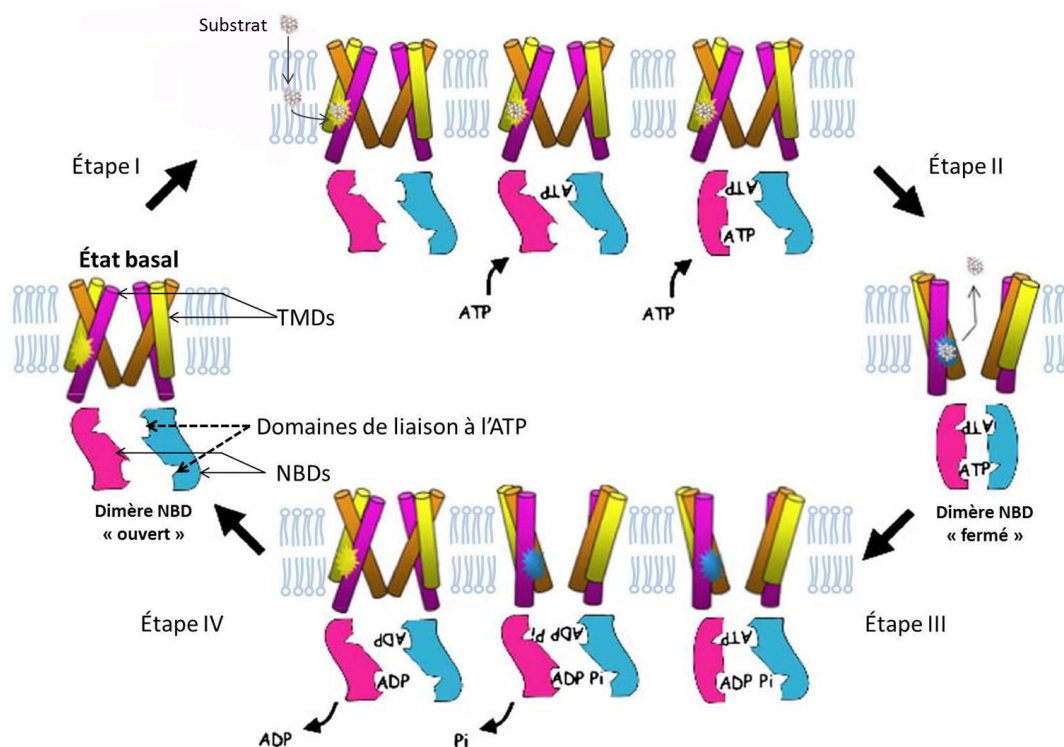


Figure 4 – Le modèle d'« ATP switch », d'après Linton et Higgins (2007).

Étape I. À l'état basal, le dimère de NBDs est dans une configuration ouverte et présente une faible affinité pour l'ATP. Le cycle est initié par la liaison du substrat sur les TMDs, provoquant une augmentation de l'affinité du NBD pour l'ATP. Deux molécules d'ATP se lient alors au niveau des NBDs.

Étape II. Le dimère de NBDs resserre autour des deux molécules d'ATP induit un changement conformationnel des TMDs, permettant de diminuer l'affinité du substrat pour le transporteur. Le substrat est alors exposé puis libéré dans le milieu extracellulaire.

Étape III. L'hydrolyse successive des deux molécules d'ATP provoque l'ouverture du dimère de NBDs.

Étape IV. La libération du phosphate et de l'ADP permet de terminer le cycle et de revenir à l'état initial.

Ces protéines ABC, sous forme de pompes unidirectionnelles, sont impliquées dans le transport d'un grand nombre de substances biologiques (peptides, hormones, sucres, ions...) mais également de substances toxiques (métaux lourds, médicaments...). En empêchant l'entrée et en effluant de nombreuses substances lipophiles présentes dans le sang, les protéines ABC protègent la BHE elle-même et par conséquent le SNC de nombreux xénobiotiques, mais empêchent ainsi un grand nombre de molécules thérapeutiques d'atteindre leur cible centrale.

Nous nous intéresserons ici aux pompes d'efflux impliquées dans les propriétés de la BHE, qui font partie des trois sous-familles suivantes :

- la sous-famille **ABCB** ou *multidrug resistance* (MDR). Dans ce groupe la protéine ABCB1, communément appelée P-glycoprotéine (P-gp), est la première pompe d'efflux à avoir été découverte au niveau de la BHE ;
- la sous-famille **ABCC** comprenant les MRPs ;
- et enfin la sous-famille **ABCG** dont fait partie la BCRP (ABCG2).

La **P-gp** fut la première protéine ABC décrite au niveau des cellules endothéliales de la BHE humaine (Cordon-Cardo *et al.*, 1989) puis fut retrouvée au sein de la BHE de nombreuses autres espèces, suggérant que cette protéine constitue un mécanisme de défense assez général du SNC chez les mammifères (Schinkel, 1999). Cette protéine, qui voit son poids moléculaire varier de 140 à 180 kDa selon son degré de glycosylation, est une pompe d'efflux largement distribuée au niveau des organes et tissus sains (Cordon-Cardo *et al.*, 1989; Staud *et al.*, 2010).

Il existe deux types de P-gp chez l'Homme : la P-gp de type I, qui nous intéresse ici, codée par le gène *MDR1* , responsable du phénotype de résistance aux médicaments et des phénomènes d'efflux de molécules au niveau de la BHE ; et la P-gp de type II, quant à elle codée par le gène *MDR2*, exprimée au niveau des hépatocytes et fonctionnant comme une translocase de phosphatidylcholine dans ce cas. La P-gp de type I est codée par deux gènes chez les rongeurs : *mdr1a* et *mdr1b*, dont les éventails de substrats se recouvrent. Tous deux sont exprimés dans le cerveau de rongeurs, mais alors que *mdr1a* s'exprime au niveau des capillaires cérébraux, *mdr1b* est uniquement présente au niveau du parenchyme cérébral.

Chez l'Homme, la P-gp (de type I) est une protéine N-glycosylée de 1280 acides aminés, formant deux parties homologues d'environ 610 acides aminés chacune et reliées entre elles par une séquence

Rôle	Transporteur		Translocase
Type	I		II
Homme	<i>MDR1</i>		<i>MDR2 (MDR3)</i>
Souris	<i>mdr1a (mdr3)</i>	<i>mdr1b (mdr1)</i>	<i>mdr2</i>

Tableau 1 – Nomenclature des gènes codant pour la P-gp chez les Mammifères, d'après Borst et Schinkel (1997).

de 60 acides aminés (Ambudkar *et al.*, 2003). Chaque partie comprend un domaine TMD constitué de 6 segments transmembranaires et une région hydrophile cytoplasmique, formée d'une boucle intracellulaire comprenant un site NBD (Figure 5).

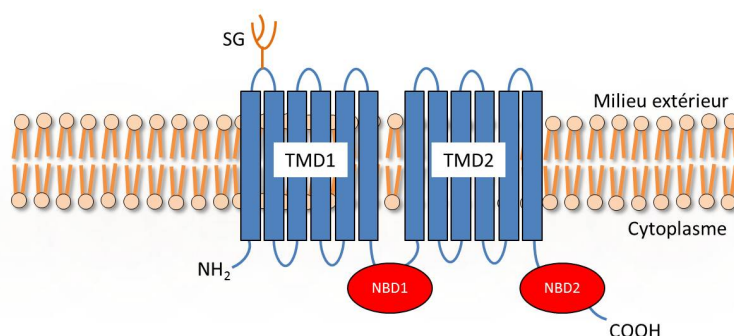


Figure 5 – **Structure de la P-gp humaine au sein de la membrane plasmique.** Modifié de Vautier *et al.* (2006). La P-gp comprend deux TMDs (séquences hydrophobes traversant la membrane cellulaire) et deux NBDs (régions hydrophiles cytoplasmiques). Les sites de glycosylation (SG) sont situés sur la première boucle extracellulaire. Les molécules d'ATP se fixent au milieu des NBDs.

Son expression est influencée par l'environnement cellulaire, puisqu'elle est renforcée dans les cellules endothéliales en coculture avec les cellules gliales (Berezowski *et al.*, 2004; Fenart *et al.*, 1998). La majorité des études portant sur la localisation subcellulaire de la P-gp au niveau des cellules endothéliales de la BHE indiquent qu'elle est principalement exprimée à leur face luminale (Bendayan *et al.*, 2006; Czeredys *et al.*, 2008; Roberts *et al.*, 2008; Virgintino *et al.*, 2002). Cependant, la localisation précise de la P-gp au sein des capillaires cérébraux fut longtemps controversée. Golden et Pardridge (1999, 2000) avaient démontré que la P-gp était majoritairement exprimée au niveau des pieds astrocytaires, et non au niveau des cellules endothéliales constituant la BHE. Ces conclusions furent critiquées (Abbott, 2002) car elles étaient basées sur l'utilisation unique d'un anticorps monoclonal (MRK16), dont l'épitope extracellulaire peut être masqué par une abondante N-glycosylation (Schinkel *et al.*, 1993). L'équipe de Pardridge a depuis rapporté la présence de la P-gp à la fois dans les cellules endothéliales et dans les astrocytes du cerveau de singes sains (Schlachetzki et Pardridge, 2003). D'autres études ont démontré une expression fonctionnelle de la P-gp dans des cultures primaires d'astrocytes (Decleves *et al.*, 2000; Ronaldson *et al.*, 2004) et la lignée astrocytaire de rat CTX TNA2 (Ronaldson *et al.*, 2004). La présence de la P-gp au niveau des astrocytes de rats a été confirmée avec l'anticorps C219, mais cette expression serait plus faible que dans les cellules endothéliales (Mercier *et al.*, 2004). La P-gp serait aussi exprimée, dans une moindre mesure, par les péricytes cérébraux comme observé *in vivo* (Bendayan *et al.*, 2006) et *in vitro* (Bere-

zowski et al., 2004; Shimizu et al., 2008).

L'une des caractéristiques de la P-gp est sa grande variété de substrats, tant du point de vue de leur structure chimique, que de leur masse moléculaire et de leur mécanisme d'action pharmacologique (*Vautier et al., 2006*). Les substrats de la P-gp sont des molécules à caractère amphiphile ou hydrophobe, de masse moléculaire variable allant de 250 Da (cimétidine, phénytoïne) à 1202 Da (cyclosporine). Chez les souris déficientes en P-gp, la pénétration cérébrale des substrats de la P-gp peut être augmentée de 10 à 100 fois, avec pour certains des conséquences dramatiques dues à la toxicité de ces composés, démontrant le rôle majeur de cette pompe d'efflux dans la protection du SNC (*Schinkel et Jonker, 2003; Schinkel et al., 1994*).

La sous-famille des **MRPs** comprend au moins 13 membres, dont 9 participent au transport actif de molécules. Ces 9 membres, qui nous intéressent ici, sont classés en 2 groupes (Figure 6) :

- les MRPs dites « courtes » (MRP 4, 5, 8 et 9), qui possèdent une structure typique des transporteurs ABC avec deux NBDs (NBD1 et 2) et deux TMDs (TMD1 et 2) (Figure 6a). Leur structure se distingue de celle de la P-gp par la présence d'une boucle intracytoplasmique à l'extrémité amino-terminale.
- les MRP « longues » (MRP 1, 2, 3, 6 et 7), dont l'extrémité amino-terminale est extracellulaire et qui présentent un TMD supplémentaire (TMD0) constitué de 5 domaines transmembranaires, s'ajoutant à la structure de base des MRPs courtes (*Tusnady et al., 1997*) (Figure 6b).

Bien qu'appartenant à une même famille et s'organisant autour d'une structure similaire (Figure 6), de faibles homologies de séquence en acides aminés ont été observées entre les différentes MRPs (*Borst et al., 2000*), laissant supposer une spécificité quant aux substrats transportés ou à la répartition de leur expression. Bien que certaines substances soient prises en charge par des membres précis de la famille des MRPs, aucune réelle spécificité n'a été démontrée, rendant plus complexe encore la compréhension de leurs fonctions respectives (*Schinkel et Jonker, 2003*). Les MRPs, associées au phénotype MDR, peuvent transporter une large gamme de substrats, généralement des anions organiques et des composés lipophiles conjugués au glutathion, glucuronidés ou sulfatés.

L'expression et la localisation des différentes MRPs au niveau de la BHE ne sont toujours pas clairement établies, notamment en raison de la divergence des résultats selon l'espèce considérée, les techniques utilisées (études transcriptomiques ou protéomiques) et le matériel analysé (microvaisseaux isolés ou cultures cellulaires). Le manque d'anticorps spécifiques dirigés contre les différents

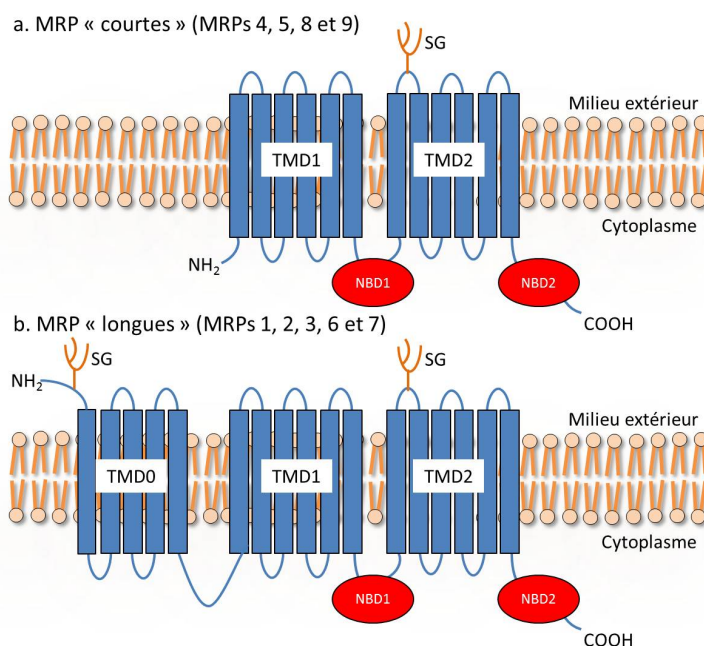


Figure 6 – Structure des MRPs au sein de la membrane plasmique, avec la localisation des sites de glycosylation (SG). Modifié de Vautier *et al.* (2006).

a. Les MRPs dites « courtes » comprennent deux TMD et deux NBDs, comme la P-gp, mais leur site de glycosylation est différent.

b. Les MRPs dites « longues » comprennent trois TMD et deux NBDs.

membres de cette famille rend cette tâche encore un peu plus difficile. Toutefois, les MRPs ont pu être retrouvées au niveau de la BHE chez différentes espèces.

La **protéine MRP 1** possède un large éventail de substrats : elle peut effluer une grande variété de composés hydrophobes neutres, ainsi que des molécules lipophiles conjuguées au glutathion, glucuronate ou sulfate (Bakos et Homolya, 2007). La protéine MRP 1 a été mise en évidence au niveau de la BHE dans des modèles cellulaires *in vitro* (Huai-Yun *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000). Son acide ribonucléique messager (ARN_m) a été détecté dans des cellules endothéliales cérébrales murines (Perrière *et al.*, 2007; Regina *et al.*, 1998; Warren *et al.*, 2009), humaines (Dauchy *et al.*, 2009; Warren *et al.*, 2009) et bovines (Berezowski *et al.*, 2004; Warren *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2000), ainsi que dans des capillaires cérébraux isolés humains (Dauchy *et al.*, 2008; Seetharaman *et al.*, 1998) et bovins (Zhang *et al.*, 2000). Cependant, alors que Berezowski *et al.* (2004) avaient détecté l'ARN_m de MRP 1 dans les cellules endothéliales cérébrales en culture, aucune amplification de cet ARN_m n'avait été observée dans le cas des capillaires isolés, suggérant une expression induite en culture, comme proposé par Seetharaman *et al.* (1998). Sa fonctionnalité au niveau de la BHE *in vivo* est d'ailleurs controversée : son activité a été mise en évidence chez le rat (Sugiyama *et al.*,

2003) mais pas chez la souris (Cisternino *et al.*, 2003). Son immunomarquage est positif mais faible à la face abluminale des microvaisseaux cérébraux isolés de rat (Roberts *et al.*, 2008).

La **protéine MRP 2**, capable de prendre en charge une grande variété d'anions organiques, a été mise en évidence dans des capillaires cérébraux isolés de rat (Miller *et al.*, 2000) en microscopie confocale. Son expression protéique et transcriptionnelle au niveau de la BHE n'a pas été retrouvée dans de nombreuses autres études (Berezowski *et al.*, 2004; Dauchy *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 2011; Nies *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 2011; Warren *et al.*, 2009).

La **protéine MRP 3** possède un éventail de substrats plus restreint que les deux premières, mais peut effluer des antifolates comme le méthotrexate, des agents anticancéreux et la morphine (Zelcer *et al.*, 2005). Son ARN_m a été détecté dans des cultures de cellules endothéliales cérébrales de rat (Perrière *et al.*, 2007) et de boeuf (Zhang *et al.*, 2000). L'analyse de l'expression transcriptionnelle de MRP 3 réalisée dans notre laboratoire n'a pu démontré son expression ni dans des cellules endothéliales en culture, ni dans des capillaires cérébraux isolés bovins (Berezowski *et al.*, 2004). Ce résultat négatif a été confirmé plus tard par Dauchy *et al.* (2008) sur des microvaisseaux humains. En revanche, Warren *et al.* (2009) ont détecté son ARN_m de façon non négligeable dans des microvaisseaux murins et porcins, et Dauchy *et al.* (2009) l'ont retrouvé dans la lignée endothéliale humaine hCMEC/D3.

Les **MRPs 4 et 5** sont deux transporteurs très proches, effluant de nombreux analogues de nucléotides et des nucléotides cycliques (Borst *et al.*, 2000). L'expression transcriptionnelle de **MRP 4** a été détectée dans des cultures primaires de cellules endothéliales de capillaires bovins (Berezowski *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2000), ainsi que dans des capillaires cérébraux humains (Dauchy *et al.*, 2008) et murins, où la protéine correspondante a été localisée face luminale (Roberts *et al.*, 2008). Une analyse protéomique récente a démontré son expression protéique au sein de microvaisseaux cérébraux isolés humains (Uchida *et al.*, 2011) et simiens (Ito *et al.*, 2011), où elle représentait la seule protéine de la famille des MRPs à être détectée.

L'expression transcriptionnelle et protéique de **MRP 5** a été démontrée au niveau de la BHE par Berezowski *et al.* (2004), Zhang *et al.* (2000), Dauchy *et al.* (2008, 2009), Nies *et al.* (2004), Perrière *et al.* (2007) et Warren *et al.* (2009), mais encore une fois d'autres études ne l'ont pas détecté (Ito *et al.*, 2011; Uchida *et al.*, 2011), ou très faiblement (Roberts *et al.*, 2008).

L'expression transcriptionnelle de **MRP 6** a été détectée dans des cultures de cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins (Berezowski *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2000) et dans des capillaires cérébraux de rat (Warren *et al.*, 2009) et humains (Dauchy *et al.*, 2008; Warren *et al.*, 2009).

Cette MRP, capable d'effluer des composés associés au glutathion, pourrait conférer un phénotype de résistance modérée à plusieurs anti-cancéreux (Belinsky *et al.*, 2002).

Peu de données sont disponibles concernant l'expression et la fonction des **MRPs 7, 8 et 9**. Cependant, l'ARN_m de MRP 7 a été détectée par Warren *et al.* (2009) de manière particulièrement importante dans des capillaires cérébraux humains. Cette protéine est une pompe d'anions lipophiles capable de conférer une forte résistance à divers anti-cancéreux, et d'effluer l'œstradiol-17 β glucuronide et le leucotriène C4 (Hopper-Borge *et al.*, 2004).

L'expression de la majorité de ces MRPs au niveau de la BHE a été récemment remise en question ; des analyses protéomiques réalisées sur des microvaisseaux cérébraux isolés chez l'Homme (Uchida *et al.*, 2011) et le macaque (Ito *et al.*, 2011) n'ont détecté aucune des protéines correspondantes, hormis MRP 4.

Les contradictions mises en exergue ici soulignent la nécessité d'améliorer la détection des MRPs au niveau des capillaires cérébraux, afin de mieux appréhender leur expression et de les localiser au niveau de la BHE. Il faut d'ailleurs noter que d'autres composantes de la BHE, dont les péricytes, seraient capables d'exprimer certaines de ces MRPs (MRP 1, 4 et 5) en culture (Berezowski *et al.*, 2004). Puisque ce type cellulaire est difficilement dissociable des capillaires isolés, les péricytes peuvent contribuer, voire être à l'origine de l'expression protéique ou transcriptionnelle de ces transporteurs au sein des capillaires isolés.

La **BCRP** (72 kDa), découverte dans une lignée cancéreuse du sein hautement résistante aux anthracyclines (Doyle *et al.*, 1998), est une glycoprotéine membranaire de 665 acides aminés possédant un seul NBD et un seul TMD (Figure 7). L'expression de la BCRP ne se limite pas à des cellules cancéreuses : elle est également retrouvée dans divers organes et tissus sains (Robey *et al.*, 2009). Considérée comme un « demi-transporteur », elle fonctionnerait sous forme d'un homodimère (Kage *et al.*, 2002). La distribution de la BCRP dans l'organisme est voisine de celle de la P-gp, suggérant que ces deux protéines agissent de concert pour protéger les cellules de xénobiotiques circulants (Schinkel et Jonker, 2003). Leurs gammes de substrats sont larges et se recouvrent (Loscher et Potschka, 2005).

Au niveau de la BHE, la BCRP a été détectée dans des capillaires cérébraux porcins (Eisenblätter *et al.*, 2003), murins (Cisternino *et al.*, 2004) et humains (Dauchy *et al.*, 2008). Sa localisation a été mise en évidence par des techniques d'immunohistochimie et des études de transport : il semble que la BCRP soit localisée face luminale des cellules endothéliales cérébrales, comme cela a été observé

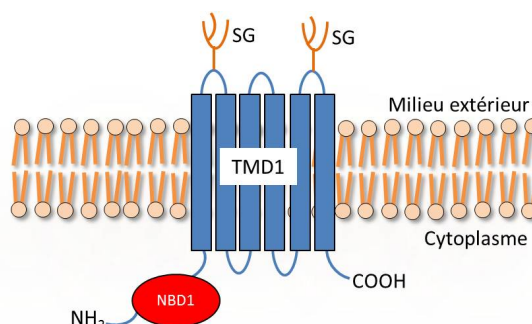


Figure 7 – Structure de la BCRP au sein de la membrane plasmique, avec la localisation des sites de glycosylation (SG). Modifié de Vautier *et al.* (2006).

chez la souris (Tachikawa *et al.*, 2005), le rat (Hori *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2008) et l'Homme (Aronica *et al.*, 2005).

Le rôle de la BCRP dans l'efflux des xénobiotiques au niveau de la BHE a été démontré par Cisternino *et al.* (2004) : le traitement des souris déficientes en P-gp avec un inhibiteur de la BCRP (le GF120918, également puissant inhibiteur de la P-gp) se traduit par une augmentation du passage de la prazosine et de la mitoxantrone à travers la BHE. Dans cette étude, l'expression de la BCRP dans les microvaisseaux cérébraux de souris dont le gène *mdr1a* a été invalidé est multipliée par trois par rapport à des souris sauvages : la surexpression de la BCRP pourrait être un mécanisme compensatoire de l'absence de la P-gp. A l'aide de souris déficientes à la fois en P-gp et en BCRP, de Vries *et al.* (2007) ont démontré le rôle important de la BCRP dans la limitation de la pénétration cérébrale du topotécan, un antinéoplasique dérivé de la camptothécine.

Du fait de sa relation étroite avec la P-gp et de son implication dans les phénomènes de résistance aux médicaments, la BCRP suscite un intérêt croissant. Des analyses protéomiques et transcriptionnelles ont d'ailleurs démontré qu'elle constituerait la pompe d'efflux la plus exprimée au niveau de la BHE - devant la P-gp - chez l'Homme (Dauchy *et al.*, 2008; Shawahna *et al.*, 2011; Uchida *et al.*, 2011), le macaque (Ito *et al.*, 2011) et le porc (Eisenblätter *et al.*, 2003).

1.3.2.2 Les autres transporteurs d'efflux

Outre les transporteurs ABC, certains membres de la superfamille des *solute carriers* (SLCs) seraient impliqués dans des phénomènes d'efflux au niveau de la BHE : il s'agit de la famille des *organic anion transporters* (OATs) et des *organic anion transporting peptides* (OATPs) (Kusuhara et Sugiyama, 2005). Différentes études de transport *in vitro* et *in vivo* indiquent qu'ils jouent un rôle

dans l'efflux de médicaments à travers la BHE (Hagenbuch *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003).

Contrairement aux transporteurs ABC, les OATs et les OATPs ne sont pas capables d'hydrolyser l'ATP ; ils fonctionnent généralement comme des échangeurs, c'est-à-dire qu'ils échangent une molécule contre une autre molécule ou ion. Soumis au gradient de concentration de part et d'autre de la cellule, le sens du transport dépend donc des gradients électrochimiques des molécules en question de part et d'autre de la membrane où le transporteur est inclus. La localisation précise des OATs et des OATPs dans le cerveau n'est pas clairement établie, mais quelques membres ont été identifiés au niveau de la BHE (Lee *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003).

Les OATs peuvent intervenir dans l'efflux de composés anioniques tels que l'acide homovanillique, la benzylpénicilline et le sulfate d'indoxyle du cerveau vers le sang (Kikuchi *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2003), et dans l'efflux des thiopurines (Mori *et al.*, 2004). Parmi eux l'Oat3, initialement isolé à partir de cerveaux de rat, a été détecté au niveau des membranes luminale et abluminale des cellules endothéliales cérébrales de rat (Kikuchi *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2003), mais serait préférentiellement exprimé au niveau abluminal selon les résultats d'immunolocalisation de Roberts *et al.* (2008), voire aussi au niveau des péricytes. Il est donc probable que l'Oat3 participe au pompage des xénobiotiques depuis le compartiment cérébral (Ohtsuki, 2004).

Les OATPs peuvent transporter ou effluer de nombreux substrats tels que des hormones thyroïdiennes, des conjugués de stéroïdes, des acides biliaires et des xénobiotiques (pour revue, voir Hagenbuch et Meier, 2004). Des expériences d'immunomarquages ont permis de visualiser l'Oatp2 (ou Oatp1a4) au niveau des membranes luminale et abluminale de l'endothélium capillaire cérébral chez le rat (Gao *et al.*, 1999; Ose *et al.*, 2009), mais une étude plus récente montre que sa localisation serait majoritairement abluminale (Roberts *et al.*, 2008). Gao *et al.* (2000) ont démontré par des expérience similaires la présence de l'OATP-A au niveau de la BHE humaine (Gao *et al.*, 2000).

Les OATs et les OATPs joueraient donc un rôle important en agissant de concert avec les pompes d'efflux de la famille ABC dans l'exclusion de composés au niveau de la BHE, participant ainsi à la détoxification du compartiment cérébral. Une telle coordination des deux systèmes a déjà été décrite par exemple dans la sécrétion rénale d'anions organiques (Russel *et al.*, 2002), et pourrait exister au niveau de la BHE. Cependant, la récente étude réalisée par Uchida *et al.* (2011) n'a permis de détecter aucun transporteur de la famille des OATs et des OATPs au sein de microvaisseaux cérébraux isolés humains, suggérant qu'ils sont absents ou sous la limite de quantification de leur méthode, couplant chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem.

Les propriétés restrictives de la BHE concourent donc à restreindre l'accès de nombreuses molécules au parenchyme cérébral. Pourtant la BHE ne peut être une barrière absolue, puisque le fonctionnement cérébral nécessite l'apport de nutriments transportés par la circulation sanguine. Ces apports sont permis par l'existence de voies de transport, le plus souvent spécifiques, à travers la BHE.

1.4 Perméabilité sélective de la BHE

À cause de la forte restriction du passage paracellulaire entre les cellules endothéliales, les molécules traversant la BHE doivent emprunter la voie transcellulaire. Quelques unes peuvent diffuser librement à travers elle (diffusion passive) mais la plupart doivent emprunter des protéines de transport ou un mécanisme de transport vésiculaire (transcytose), permettant les échanges nécessaires entre les compartiments sanguin et cérébral (Figure 8).

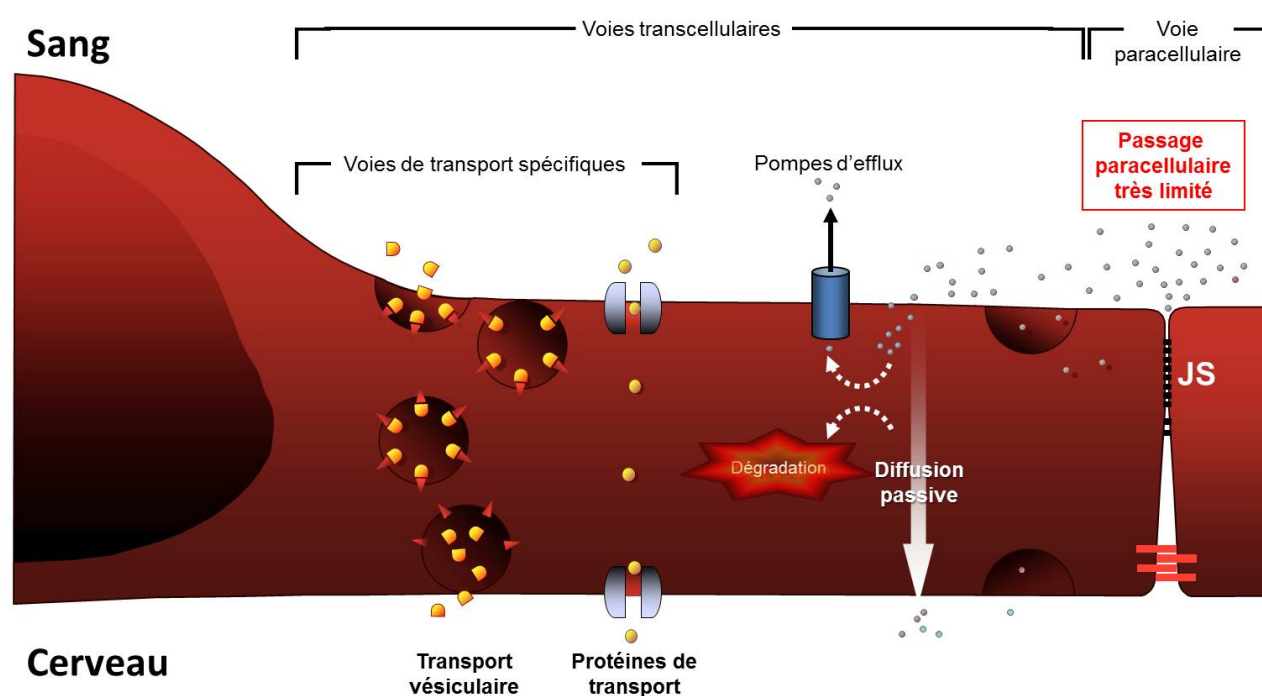


Figure 8 – Schéma représentant les différentes voies de transport au travers de l'endothélium formant la BHE. La présence des jonctions serrées (JS) limite fortement le *passage paracellulaire* de molécules. Les composés présents dans la circulation sanguine doivent donc atteindre la parenchyme cérébral selon différents modes de *transport transcellulaire*. S'ils ne peuvent pas traverser la BHE par *diffusion passive*, ils doivent emprunter des *protéines de transport* (canaux, transporteurs et pompes) ou un *transport vésiculaire* (transcytose), selon leur nature (ions, peptides, macromolécules, etc.).

1.4.1 La diffusion passive

On parle de diffusion passive lorsqu'une molécule peut passer librement au travers d'une membrane selon son gradient de concentration, ce processus se réalisant sans intervention de transporteur ni consommation d'énergie. Seules quelques substances lipophiles (comme l'éthanol ou la nicotine) ainsi que de petites molécules (comme le dioxygène et le dioxyde de carbone) peuvent diffuser librement à travers la BHE de cette manière (Grieb *et al.*, 1985). Leur passage est alors uniquement gouverné par leur gradient de concentration entre le sang et le liquide extracellulaire cérébral. Un grand nombre de molécules lipophiles devraient en théorie traverser la BHE par diffusion, mais leurs propriétés font qu'elles sont aussi substrats des pompes d'efflux précédemment décrites telles que la P-gp, et sont donc effluées vers le sang.

1.4.2 La diffusion facilitée

Au niveau de l'endothélium formant la BHE, un certain nombre de transporteurs facilitent le transport de nutriments tels que le glucose, des acides aminés (qu'ils soient neutres, basiques ou acides), des acides monocarboxyliques (lactate, pyruvate, corps cétoniques), des nucléosides (adénosine, guanosine, uridine), des purines (adénine, guanine), des amines (choline) ou encore des vitamines. Concernant les nutriments, les gradients sont généralement décroissants du sang vers le cerveau. Ce mécanisme de transport, qui ne nécessite pas d'énergie, est donc régulé par les besoins métaboliques du cerveau d'une part et les concentrations plasmatiques en substrats d'autre part.

Le **transport du glucose** est d'une importance toute particulière puisque cet hexose représente la principale source d'énergie nécessaire à l'activité cérébrale (Simpson *et al.*, 2007). Le *glucose transporter-1* (GLUT-1) (isoforme de 55 kDa) est le transporteur de glucose majoritairement exprimé au niveau de la BHE, d'ailleurs spécifique à cet endothélium (Pardridge *et al.*, 1990). Transportant le D-glucose mais pas le L-glucose, il est aussi capable de prendre en charge d'autres hexoses comme le D-mannose, le D-galactose et le D-xylose (Lund-Andersen, 1979). La membrane abluminale des cellules endothéliales de la BHE présente une densité trois fois plus importante de ce transporteur que la membrane luminale (Simpson *et al.*, 2007).

Le **transport des acides aminés** est d'une grande importance au niveau du SNC puisqu'ils sont nécessaires à la synthèse protéique en général et à la production de neurotransmetteurs. Le SNC

n'est pas autonome concernant la production de la majorité des acides aminés qu'il utilise : les besoins métaboliques du cerveau nécessitent donc un apport en acides aminés qui seront puisés dans la circulation sanguine. Deux groupes de transporteurs d'acides aminés existent et cohabitent au niveau des cellules endothéliales constituant la BHE (Figure 9), caractérisés par leur spécificité de substrat et leur dépendance au sodium (Hawkins *et al.*, 2006) :

- les **transporteurs responsables de la diffusion facilitée d'acides aminés** (indépendants des ions Na^+), présents au sein des membranes luminale et abluminale des cellules endothéliales. Ces transporteurs constituent quatre systèmes différents : les systèmes L1, y^+ , n et x_G^- . Les deux premiers sont présents au sein des membranes luminales et abluminales, alors que les deux derniers sont présents exclusivement face luminale. Le système L1 représente la voie principale du transport des acides aminés neutres essentiels au cerveau, et le système y^+ est le principal pourvoyeur d'acides aminés cationiques (lysine, arginine et ornithine). Le système x_G^- permet le transport de glutamate et d'aspartate, et le système n prend en charge la glutamine et l'asparagine.
- les **transporteurs dépendants des ions Na^+** , quant à eux localisés exclusivement membrane abluminale des cellules endothéliales. Il s'agit des systèmes A (*alanine-preferring*), ASC/B^{0,+} (*alanine, serine, cysteine-preferring*), LNAA (*large neutral amino acids*), EAAT (*excitatory amino acid transporter*) et N (*nitrogen-rich amino acids*). Ils sont responsables du transport actif d'acides aminés du parenchyme cérébral vers le sang, et font donc partie des mécanismes d'efflux décrits précédemment.

Le **transport des acides monocarboxyliques** s'effectue *via* le *monocarboxylate transporter-1* (MCT-1), exprimé luminalement et abluminalement au niveau des cellules endothéliales (Leino *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 2007). Il intervient notamment dans le transport du lactate et des corps cétoniques, qui peuvent constituer une source d'énergie pour le cerveau dans certaines situations (période de jeûne, allaitement). Les concentrations plasmatiques des substrats de MCT-1 régulent son expression (Simpson *et al.*, 2007).

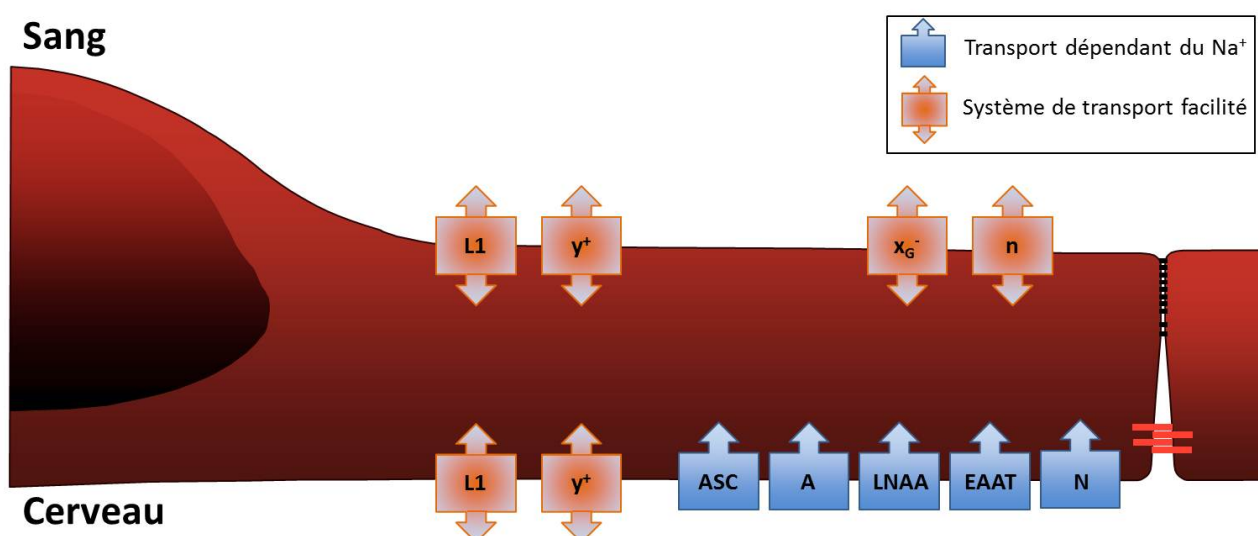


Figure 9 – Les différents systèmes de transport des acides aminés au niveau de la BHE. Modifié de Hawkins *et al.* (2006) et Redzic (2011).

Le cerveau a accès à tous les acides aminés essentiels grâce au *transport facilité* permis par les système L1 et γ^+ , qui sont exprimés sur les deux faces des cellules endothéliales. Les deux autres systèmes impliqués dans le transport facilité - x_G^- et n - existent uniquement au niveau de la membrane luminale, permettant le transport de glutamate, d'aspartate, de glutamine et d'asparagine. Les *systèmes dépendant du Na^+* sont responsables de l'élimination des acides aminés non-essentiels et toxiques, et maintiennent les concentrations des autres acides aminés à leur niveau optimal. L'éventail de leurs substrats, comme pour les systèmes de transport facilité, se recouvre. Tous les acides aminés naturels sont transportés par au moins un de ces systèmes, certains sont substrats de trois systèmes à la fois.

1.4.3 Le transport de l'eau et des ions

1.4.3.1 Le transport de l'eau

La répartition des ions, indispensables à l'activité neuronale et au fonctionnement de nombreux canaux et transporteurs, est liée à l'homéostasie de l'eau. Les aquaporines (AQPs) forment une famille de canaux qui, selon les sous-types, facilitent les flux d'eau et/ou de solutés (glycérol et urée notamment) à travers les membranes de nombreux types cellulaires (Badaut *et al.*, 2002) (Figure 10). Elles forment des pores permettant le transport bidirectionnel de l'eau selon les principes de l'osmolarité. Jusqu'à présent 13 aquaporines ont été décrites chez l'Homme (Sorani *et al.*, 2008).

Sur les six aquaporines décrites au niveau du cerveau de rongeurs (AQP 1, 3, 4, 5, 8 et 9) c'est l'AQP-4, l'une des premières aquaporines découvertes au niveau du SNC, qui a fait l'objet de la majorité des études. Au niveau de la BHE, l'AQP 4 est l'aquaporine la plus abondamment exprimée : elle y est localisée au niveau des pieds astrocytaires en contact avec les capillaires cérébraux (Nielsen *et al.*, 1997), et est en étroite association avec le transport des ions K^+ (Wolburg *et al.*, 2009).

La fonction de cette protéine au niveau de la BHE en conditions physiologiques est controversée,

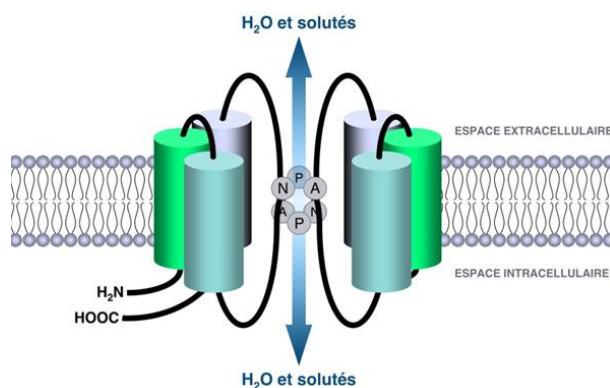


Figure 10 – **Structure générale des aquaporines.** Adapté de [Badaut et al. \(2002\)](#).

Les aquaporines sont formées d'un tandem de 3 hélices α transmembranaires. Deux boucles connectées, contenant chacune un motif Asn-Pro-Ala (NPA), forment un pore de 3 à 6 Å de diamètre au sein de la membrane plasmique, permettant le passage de molécules d'eau et de solutés.

comme le démontrent des études réalisées *in vivo* sur les souris déficientes en AQP 4 : alors que [Zhou et al. \(2008\)](#) y décrivent une altération de l'intégrité de la BHE associée à une immunoréactivité réduite de la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) au niveau astrocytaire, [Saadoun et al. \(2009\)](#) n'observent pas d'altération ni de la BHE ni des cellules parenchymateuses (neurones, astrocytes, oligodendrocytes).

En revanche, l'AQP 4 semble jouer un rôle important au niveau de la BHE en conditions pathologiques ([Francesca et Rezzani, 2010](#)). À la lumière de plusieurs études menées sur des animaux déficients ou présentant une délocalisation de l'AQP 4, il semble que cette protéine soit impliquée dans la formation des œdèmes cérébraux ([Amiry-Moghaddam et al., 2004](#); [Manley et al., 2000](#)). La déficience en AQP 4 apparaît bénéfique car elle est associée à un œdème cytotoxique réduit suite à une ischémie, une intoxication aiguë à l'eau et une méningite bactérienne ([Manley et al., 2000](#); [Papadopoulos et Verkman, 2005](#)) ; en revanche, elle semble néfaste car elle intensifie l'œdème vasogénique associé aux tumeurs cérébrales par exemple ([Papadopoulos et al., 2004](#)).

La fonction exacte de cette protéine au niveau de la BHE n'est donc pas encore clairement établie.

1.4.3.2 Le transport des ions

Le transport des ions implique l'intervention de différents canaux ioniques, localisés au niveau des membranes luminale et abluminale des cellules endothéliales de la BHE (Figure 11).

L'ATPase Na^+/K^+ , qui est responsable de l'influx actif de sodium vers le parenchyme cérébral en échange de potassium, est principalement localisée face abluminale des cellules endothéliales de la BHE ([Bradbury et Stulcova, 1970](#); [Nag, 1990](#)). Cette pompe permet le maintien du gradient de

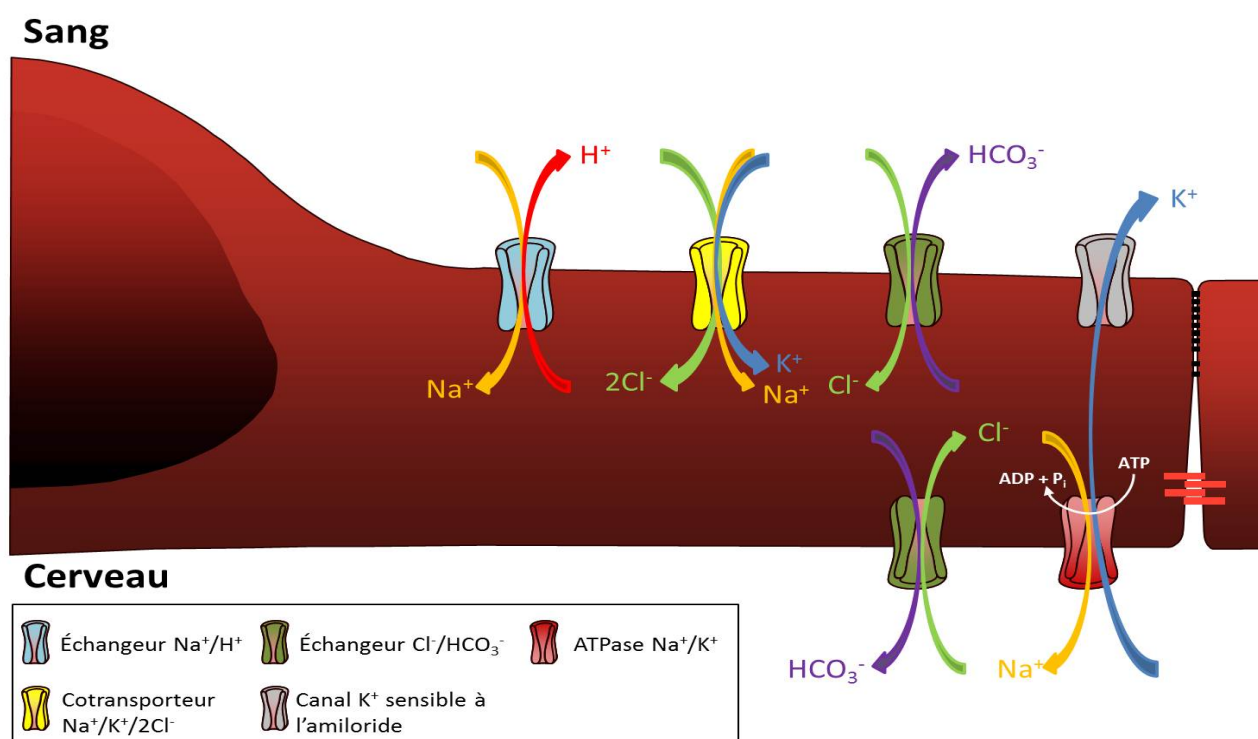


Figure 11 – Le transport ionique au niveau des cellules endothéliales formant la BHE. Modifié de Zlokovici (2008).

sodium existant au niveau de la BHE ($[\text{Na}^+]_{\text{extracellulaire}} \gg [\text{Na}^+]_{\text{intracellulaire}}$), de telle sorte que les différents transports dépendants du Na^+ puissent avoir lieu.

Compte tenu du rôle important des ions K^+ dans la transmission de l'influx nerveux, leur concentration dans le liquide interstitiel cérébral doit être stable (2,8 mM), alors qu'elle varie dans le sang (de 3 à 5 mM) (Bradbury et Kleeman, 1967). Ce maintien est permis par l'élimination de l'excès de K^+ par les astrocytes et par un transport du K^+ du cerveau vers le sang plus important que le transport dans le sens inverse. Pour cela, les ions K^+ présents dans le liquide interstitiel sont pris en charge par l'ATPase Na^+/K^+ puis rejoignent le compartiment sanguin grâce à des **canaux K^+ sensibles à l'amiloride** (Vigne *et al.*, 1989).

Le **cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$** , principalement exprimé au niveau de la membrane luminale (O'Donnell *et al.*, 2006), transporte les quatre ions du sang vers le cytoplasme endothélial.

L'**échangeur Na^+/H^+** , localisé au niveau luminal, permet l'exclusion d'un proton contre l'entrée d'un ion sodium. L'**échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$** , quant à lui exprimé à la fois faces luminale et abluminale des cellules endothéliales, est impliqué dans l'entrée d'ions chlorure dans la cellule endothéliale contre la sécrétion d'ions hydrogénocarbonate. Ces deux protéines jouent donc un rôle dans la régulation du pH (Taylor *et al.*, 2006).

1.4.4 La transcytose

Les mécanismes de transcytose fournissent la voie principale de transport des macromolécules, telles que les peptides et les protéines, pour leur permettre d'atteindre le parenchyme cérébral. En effet, alors que la grande majorité des macromolécules présentes dans le sang ne sont pas capables de traverser la BHE, des systèmes de transcytose - certains spécifiques et d'autres non-spécifiques - prennent en charge le transport de grosses molécules et de complexes à travers elle.

Au niveau de la BHE, ces transports vésiculaires sont de deux natures : la transcytose par adsorption et la transcytose dépendante de récepteurs.

1.4.4.1 La transcytose par adsorption

Elle nécessite que la molécule à transporter présente un excès de charges positives la rendant cationique, afin qu'elle puisse interagir de manière électrostatique avec le glycocalyx endothélial (quant à lui chargé négativement). Cette interaction induit une endocytose, qui précède la transcytose jusqu'à la membrane opposée (Herve *et al.*, 2008; Tamai *et al.*, 1997). La liaison mise en jeu est non-spécifique. Un certain nombre de protéines polycationiques comme la protamine ou les histones peuvent ainsi être transportées à travers la BHE (Herve *et al.*, 2008).

1.4.4.2 La transcytose dépendante de récepteurs

Ce type de transcytose implique que la macromolécule se lie spécifiquement à son récepteur au niveau de la cellule endothéliale, cette liaison déclenchant l'évènement endocytotique subséquent. Les *complexes récepteur/ligand* se concentrent au niveau de zones membranaires qui s'invagineront pour former des vésicules. Ces vésicules sont « internalisées » et traversent le cytoplasme endothélial. La fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane plasmique cellulaire opposée entraîne enfin la libération du ligand dans le milieu extracellulaire (exocytose).

Dans les deux cas, pour permettre une transcytose effective et donc la libération d'une protéine (ou d'un peptide) intacte après son passage au travers de la cellule endothéliale, le cheminement emprunté par la vésicule doit contourner la voie lysosomale pour empêcher la dégradation de son contenu. Cette voie d'échappement n'apparaît pas courante au niveau des endothélia périphériques, et pourrait constituer une caractéristique de la BHE (Abbott *et al.*, 2010).

Deux principaux types de vésicules sont impliquées dans l'« internalisation » des complexes récepteur/ligand.

Les puits/vésicules recouvert(e)s de clathrine. Une molécule de clathrine (650 kDa) présente trois membres (d'où la dénomination de *triskelions*, du grec signifiant « tripode »), chaque membre contenant une chaîne lourde et une chaîne légère (Figure 12a). Les triskelions polymérisent pour former un treillis polygonal qui tend à s'incurver, donnant sa forme à la vésicule naissante (Figure 12b) qui apparaît dense aux électrons (Figure 12c). Les vésicules recouvertes de clathrine mesurent de 100 à 150 nm. Ces vésicules sont sensées diriger les molécules qu'elles transportent vers la dégradation lysosomale (Anderson *et al.*, 1977), mais au niveau de la BHE cette voie est parfois empruntée lors de la transcytose dépendante de récepteurs, comme cela a pu être démontré pour l'anticorps à chaîne unique FC5 (Abulrob *et al.*, 2005).

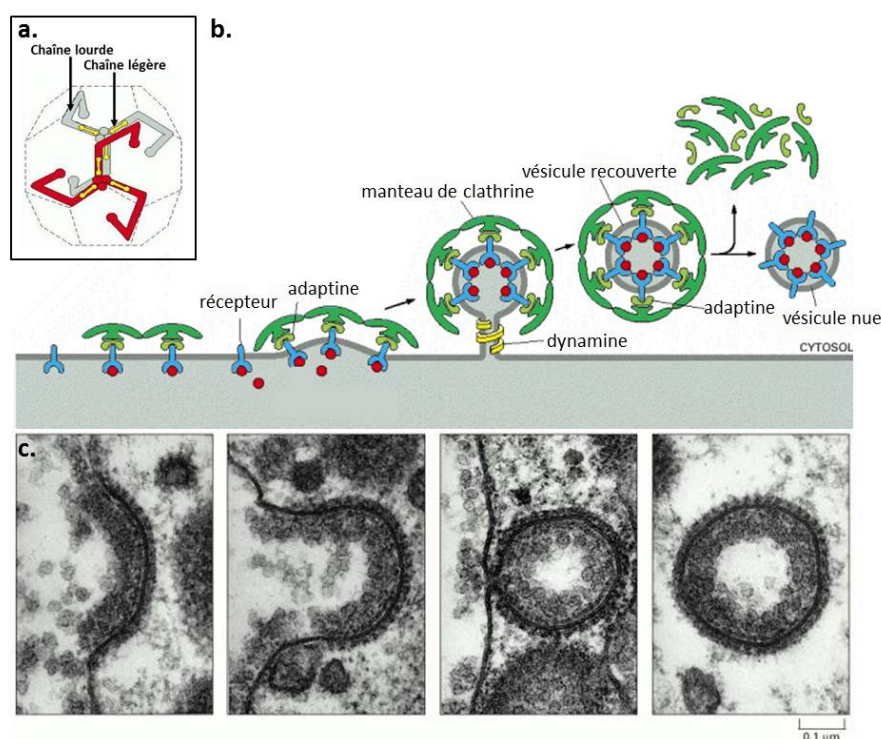


Figure 12 – **Structure de la clathrine et formation des vésicules recouvertes de clathrine.**

a. Structure des triskelions de clathrine. Chaque membre constituant le triskelion de clathrine comprend une chaîne légère et une chaîne lourde. La polymérisation des triskelions forme un treillis polygonal donnant sa forme à la vésicule naissante. Modifié de Nathke *et al.* (1992).

b. Assemblage et désassemblage du manteau de clathrine. La polymérisation de la clathrine entraîne une incurvation de la surface membranaire, menant ensuite à la formation d'une vésicule recouverte de clathrine dans le cytoplasme. L'adaptine se lie à la fois aux récepteurs internalisés et aux triskelions de clathrine, permettant le recrutement de la membrane et du ligand du récepteur pour former un puits. Le détachement du puits pour former la vésicule nécessite un phénomène de fusion de membrane, aidé par la dynamine.

c. Photographies de microscopie électronique illustrant la formation progressive d'une vésicule recouverte de clathrine, observée lors de l'entrée des lipoprotéines du vitellus dans un ovocyte de poule (Perry et Gilbert, 1979). Les complexes récepteur/ligand se concentrent à la surface externe de la membrane, formant ensuite un puits puis une vésicule recouverte de clathrine, qui apparaît dense aux électrons.

Les cavéoles. Elles se présentent sous forme d'invaginations membranaires de plus petite taille que les vésicules recouvertes de clathrine (environ 70 nm de diamètre, Figure 13a). Leur formation a lieu par invagination de domaines membranaires appelés « radeaux lipidiques », particulièrement riches en cholestérol et en sphingolipides (Figure 13b). Les radeaux lipidiques donnant naissance aux cavéoles se caractérisent par une richesse en cavéoline-1 (Lajoie et Nabi, 2007). Ces cavéoles régulent la perméabilité transcellulaire en régulant l'endocytose, la transcytose et la signalisation dans les microdomaines lipidiques de la BHE (Parton et Richards, 2003). La membrane des cavéoles présente des récepteurs impliqués dans la transcytose de la transferrine, de l'insuline, de l'albumine, des *low density lipoproteins* (LDLs), des *high density lipoproteins* (HDLs), de l'interleukine (IL)-1 et *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) (Nag, 2011). L'utilisation de notre modèle *in vitro* de BHE a permis de démontrer l'implication des cavéoles dans le transport des LDLs à travers la BHE (Candela *et al.*, 2008; Dehouck *et al.*, 1997). De plus, les cavéoles régulent une grande variété de molécules de signalisation (Thomas et Smart, 2008).

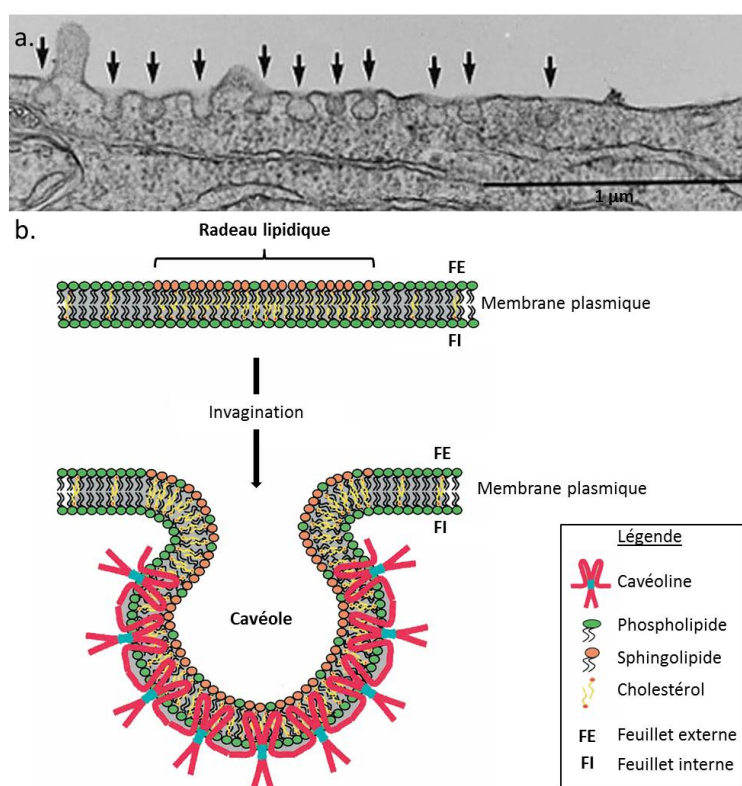


Figure 13 – **Formation des cavéoles à partir des radeaux lipidiques de la membrane plasmique.**

a. Photographies de microscopie électronique illustrant la formation de cavéoles (flèches) à la surface apicale d'une cellule endothéliale en culture (Candela *et al.*, 2008).

b. Formation des cavéoles à partir des radeaux lipidiques (microdomaines membranaires particulièrement riches en cholestérol et sphingolipides). Les domaines membranaires donnant naissance aux cavéoles se caractérisent par leur richesse en cavéoline-1. Modifié de Razani *et al.* (2002).

Les cellules endothéliales cérébrales, du fait de leurs caractéristiques physiques et métaboliques, constituent donc le siège anatomique de la BHE. Les propriétés qu'elles présentent ne sont cependant pas intrinsèques à l'endothélium cérébral mais sont induites, comme nous allons le voir, par l'environnement qui les entoure.

1.5 Composants cellulaires et acellulaires induisant les propriétés de la BHE

Le rôle de l'environnement tissulaire cérébral dans l'induction des propriétés de barrière au niveau des cellules endothéliales microvasculaires a été illustré par l'expérience de [Stewart et Wiley \(1981\)](#), qui greffèrent un tissu cérébral embryonnaire de caille non encore vascularisé dans la cavité coelomique d'un embryon de poulet. Le tissu cérébral fut progressivement vascularisé par des vaisseaux d'origine abdominale : les vaisseaux ainsi formés au sein du greffon présentaient des caractéristiques structurelles, fonctionnelles et histochimiques de la BHE (forte densité mitochondriale, réinduction des jonctions serrées, de la phosphatase alcaline et de la cholinestérase). A l'inverse, le tissu somitique (mésoderme dorsal) de caille greffé dans le cerveau de poulet fut vascularisé par des vaisseaux d'origine cérébrale qui contenaient peu de jonctions serrées mais de nombreuses vésicules de pinocytose, et présentant peu de mitochondries. L'injection de bleu Trypan révéla que les vaisseaux ayant envahi le greffon cérébral restreignaient le passage du colorant à travers la paroi vasculaire, alors que les vaisseaux s'étant développés dans le greffon mésodermique ne présentaient pas de propriété restrictive. Un dispositif expérimental similaire permit de démontrer l'induction de l'expression de la protéine HT7 - une glycoprotéine spécifique à l'endothélium formant la BHE - au sein des microvaisseaux envahissant le greffon cérébral ([Ikeda et al., 1996](#)). Ces expériences cruciales démontraient alors que les interactions entre le parenchyme cérébral et le tissu vasculaire en développement étaient nécessaires à l'établissement du phénotype de BHE. De plus il est connu que, rapidement après isolement, les microvaisseaux cérébraux et les cellules endothéliales cérébrales perdent une partie de leurs propriétés ([Rubin et al., 1991](#)), indiquant que c'est le tissu environnant la microvasculature cérébrale qui détermine ses propriétés.

Ces observations indiquent le rôle inducteur de l'environnement cérébral dans l'établissement de la BHE, mais cet environnement inclut des composantes cellulaires (cellules gliales, neurones et péricytes) et acellulaires (matrice extracellulaire) qui peuvent - individuellement ou en combinaison - être à l'origine de cette induction.

1.5.1 Les astrocytes

L'observation de la microvasculature cérébrale indique que de nombreux prolongements astrocytaires forment un manchon continu autour de ces vaisseaux (Figure 14), suggérant l'existence d'interactions réciproques entre astrocytes et capillaires cérébraux. De ces considérations anatomiques est née l'idée qu'une influence inductrice de la glie astrocytaire pourrait être responsable du développement du phénotype de BHE au niveau de l'endothélium cérébral (Davson et Oldendorf, 1967).

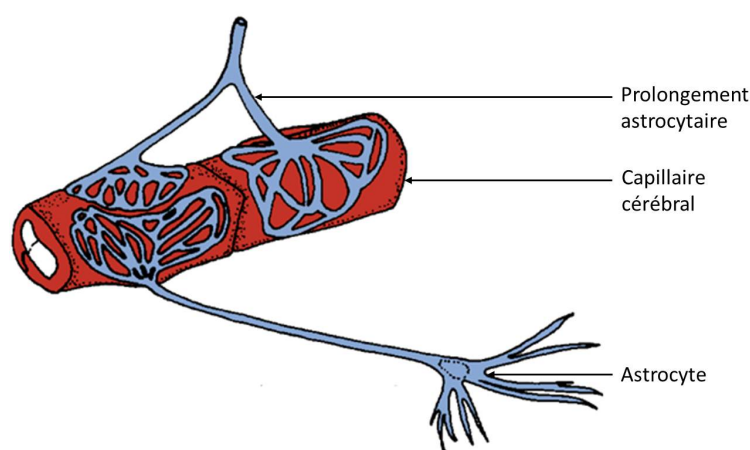


Figure 14 – Schéma représentant la forme particulière et la densité des pieds astrocytaires contactant la paroi microvasculaire au niveau des capillaires cérébraux formant la BHE. Modifié de Abbott (2002). D'après les observations de Kacem *et al.* (1998), les astrocytes contactent la paroi microvasculaire en formant des structures en rosette à la surface des capillaires cérébraux, par l'intermédiaire de leurs prolongements pédiculés. Les pieds astrocytaires occupent plus de 85% de la surface des capillaires cérébraux, formant un manchon quasi-continu (Fenstermacher *et al.*, 1988).

Delorme *et al.* (1968) et Wolff et Bar (1972) furent les premiers à observer qu'au cours du développement, l'établissement de la BHE coïncide avec la formation des manchons astrocytaires et de la membrane basale autour des capillaires cérébraux. Le rôle des astrocytes dans ce processus a été démontré *in vivo* par l'inoculation d'astrocytes de rat nouveau-né purifiés dans la chambre antérieure de l'oeil d'un rat adulte : les cellules injectées formèrent un agrégat à la surface de l'iris, qui se vascularisa en 48 heures. Deux semaines plus tard, les vaisseaux présentaient les caractéristiques d'une BHE imperméable, avec l'établissement de jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales (Janzer et Raff, 1987). Cependant, l'importance des astrocytes dans ce système particulier fut contestée plus tard, sur la base d'arguments mettant en cause le dispositif expérimental lui-même, puisque les microvaisseaux de l'iris sont imperméables aux colorants, même en absence des astrocytes (Small *et al.*, 1993). Krum et Rosenstein (1993) démontrèrent que la destruction des neurones et de la glie n'entraînait pas forcément de destructuration de la BHE *in vivo*. Ces résultats

contradictoires mettent en lumière l'importance des conditions locales et du degré de maturité des tissus dans les expériences de greffe. De nombreuses études s'accordent sur l'apparition progressive du phénotype de BHE dans les vaisseaux sanguins en croissance au sein du SNC en développement (Abbott, 2002; Bauer et Bauer, 2000).

De nombreuses autres investigations, menées quant à elles *in vitro*, ont permis de mieux appréhender et souvent de confirmer le rôle majeur joué par les astrocytes dans l'induction des propriétés structurales et métaboliques de l'endothélium cérébral. C'est en cocultivant des cellules endothéliales cérébrales et des cellules gliales que DeBault (1981) et DeBault et Cancilla (1980) démontrèrent une augmentation de l'activité γ -GT par rapport à des cellules endothéliales cultivées seules. Ce résultat fut confirmé lors de nombreuses autres expériences (Dehouck *et al.*, 1990; Maxwell *et al.*, 1987; Roux *et al.*, 1994; Tontsch et Bauer, 1991). D'autres études ont permis de montrer le rôle crucial des astrocytes dans la différenciation et le maintien de la BHE, en renforçant les jonctions serrées (Dehouck *et al.*, 1990; Wolburg *et al.*, 1994), ou encore l'expression de pompes d'efflux comme la P-gp et certaines MRPs (Berezowski *et al.*, 2004).

Cependant, certains auteurs mettent en avant le fait que certaines caractéristiques de la BHE apparaissent au niveau des cellules endothéliales cérébrales très précocement, avant la gliogenèse (Saunders *et al.*, 2000), et que les capillaires des organes circumventriculaires ne forment pas de barrière malgré la présence des astrocytes (Engelhardt, 2006). D'ailleurs lors de l'angiogenèse, les cellules endothéliales cérébrales microvasculaires n'entrent pas en contact uniquement avec les cellules gliales (ou leurs précurseurs) : elles interagissent en premier lieu étroitement avec les cellules qui les accompagnent lors de la formation des vaisseaux sanguins, les péricytes cérébraux. Ces derniers pourraient donc précocement influencer la formation de la BHE.

1.5.2 Les péricytes

À l'inverse des cellules astrocytaires, l'implication des péricytes dans la mise en place de BHE a fait l'objet de beaucoup moins d'études, alors que ce type cellulaire est idéalement positionné pour créer une interface entre le système circulatoire et le parenchyme cérébral (Figure 1).

Les péricytes sont des cellules périvasculaires associées aux lits capillaires de tout l'organisme, mais sont beaucoup plus nombreux au niveau de la rétine et du cerveau, où les ratios péricytes/cellules endothéliales sont respectivement estimés à 1/1 et à 1/3 (Bonkowski *et al.*, 2011; Tilton *et al.*, 1985). Pour comparaison, les capillaires du muscle squelettique ne possèdent qu'un péricyte pour 100 cellules endothéliales (Shepro et Morel, 1993). Même si la raison de cette distribution particulière selon

les organes et tissus n'est pas connue, il est intéressant de noter que le ratio péricytes/cellules endothéliales est plus élevé au niveau des capillaires où siègent des barrières hémato-tissulaires.

Les études menées sur des souris déficientes en péricytes ont permis d'étudier *in vivo* la fonction des péricytes dans divers organes, dont le cerveau. Ces souris sont mutées pour des gènes impliqués dans la voie de signalisation *Platelet-Derived Growth Factor-B* (PDGF-B)/*Platelet-Derived Growth Factor Receptor-β* (PDGFR-β), qui est nécessaire au recrutement des péricytes lors de l'angiogenèse (Gaengel *et al.*, 2009; Gerhardt et Betsholtz, 2003; Lee *et al.*, 2009). Les cellules endothéliales en migration (ou « tip cells ») secrètent le PDGF-B alors que les précurseurs des péricytes expriment le récepteur PDGFR-β (Armulik *et al.*, 2005) (Figure 15).

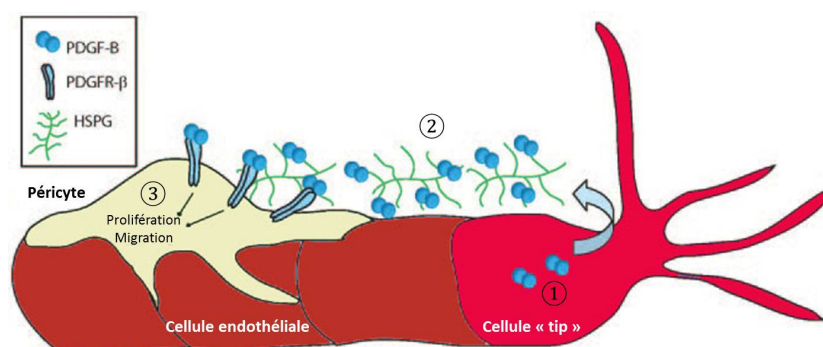


Figure 15 – **La voie de signalisation PDGF-B/PDGFR-β lors de l'angiogenèse.** Modifié de Armulik *et al.* (2005). Cette voie de signalisation est nécessaire au recrutement des péricytes lors de l'angiogenèse, selon les modalités suivantes :

- ① Le PDGF-B est synthétisé et sécrété majoritairement par la cellule endothéliale en migration se trouvant à l'extrémité du capillaire en développement, appelée « cellule tip ».
- ② La liaison du PDGF-B aux héparane sulfate protéoglycanes (HSPGs) est important pour la localisation de ce facteur au voisinage du vaisseau en développement.
- ③ Les péricytes, qui expriment le PDGFR-β, dépendent du PDGF-B pour leur prolifération et migration.

Selon le degré d'altération de cette voie, ces souris mutantes peuvent être quasiment dépourvues de péricytes, mais elles meurent à la naissance d'hémorragies microvasculaires multiples (Lindahl *et al.*, 1997), ou présenter une déficience relative en péricytes ; elles sont alors viables et leur phénotype peut donc être analysé à l'âge adulte (Armulik *et al.*, 2010; Lindblom *et al.*, 2003). Elles ont donc été utilisées comme des modèles permettant d'observer l'angiogenèse cérébrale en absence de péricytes : l'absence des péricytes est corrélée à une hyperplasie endothéliale, à une augmentation du diamètre capillaire et une augmentation de la perméabilité endothéliale (Hellstrom *et al.*, 2001).

Armulik *et al.* (2010) ont utilisé les souris adultes présentant des déficiences en péricytes variables, et confirmé qu'une diminution de la densité en péricytes était corrélée à une augmentation du diamètre des vaisseaux. Ils ont aussi démontré une corrélation inverse entre la densité de péricytes

et le degré d'extravasation de divers traceurs dont le bleu d'Evans (961 Da) un marqueur d'intégrité de la BHE souvent utilisé *in vivo*. Cependant, quel que fut le degré d'ouverture de la BHE observé, les complexes jonctionnels scellaient toujours l'espace intercellulaire et leurs protéines (ZO-1, claudine-5, VE-cadhérine) étaient exprimées comme chez les témoins. Seule une déformation des zones de contact intercellulaire a pu être observée. En revanche et de manière intéressante, l'augmentation de perméabilité a pu être associée à une augmentation du transport vésiculaire à travers les cellules endothéliales. L'étude de l'expression transcriptionnelle de marqueurs de la BHE au niveau de fragments microvasculaires isolés a montré que la majorité de ces marqueurs n'étaient pas affectée, suggérant un effet mineur des péricytes sur l'expression endothéliale des marqueurs de la BHE (Figure 16). Enfin, l'étude de la population astrocytaire chez les souris déficientes en péricytes révéla une désorganisation dans la localisation de l'AQP-4 : alors que son expression est normalement restreinte aux pieds astrocytaires (Figure 16a), elle s'étendait dans ce cas à toute la surface membranaire des astrocytes (Figure 16b). Ces résultats suggèrent une influence des péricytes sur les cellules endothéliales de la BHE passant par la restriction du transport vésiculaire et par une désorganisation de la polarité astrocytaire. Cependant, les péricytes semblent peu influencer d'autres aspects propres à la BHE, tels que l'expression de transporteurs et marqueurs spécifiques.

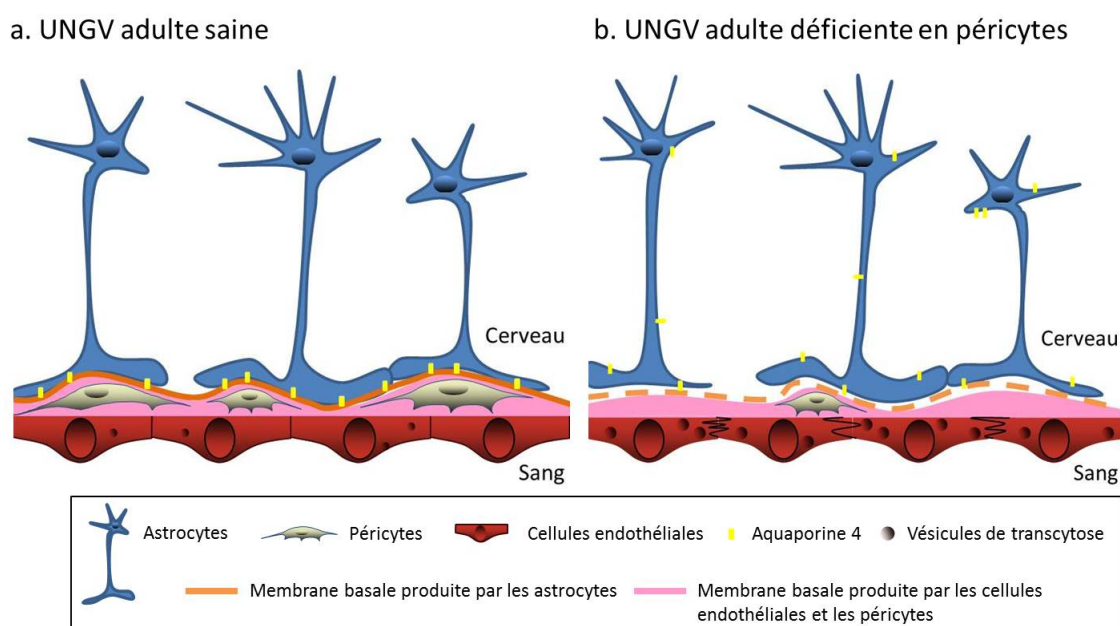


Figure 16 – Les modifications de l'UNGV chez les souris adultes présentant une déficience en péricytes. Adapté de [Armulik et al. \(2010\)](#). Par rapport à la condition saine (a.), les souris déficientes en péricytes (b.) présentent un endothélium cérébral montrant des zones de contact intercellulaires en lacets et une augmentation importante du transport vésiculaire. La déficience en péricytes affecte aussi la distribution de l'AQP4 au niveau des astrocytes, qui se répartit sur toute la membrane astrocytaire (b.), alors qu'elle devrait uniquement se localiser au niveau des pieds astrocytaires (a.). Dans ces conditions, le dépôt de la membrane basale par les astrocytes est altéré (b.).

Daneman *et al.* (2010) étudièrent quant à eux la formation de la BHE à l'aide des souris fortement déficientes en péricytes. Ces animaux, qui meurent à la naissance, permettent tout de même l'étude des événements embryonnaires associés à la mise en place de la BHE. Les conclusions de cette étude rejoignent celle de l'étude précédente : en absence de péricytes, les cellules endothéliales microvasculaires présentent une augmentation du transport vésiculaire par rapport aux souris sauvages mais, ni l'expression des protéines des complexes jonctionnels, ni l'expression de gènes spécifiques de la BHE ne sont affectées. Les gènes dont l'expression était régulée positivement en absence de péricytes sont associés à une augmentation de la perméabilité vasculaire, dont *Angpt2* (codant pour l'angiopoïétine 2), *Plvap* (impliqué dans le trafic vésiculaire) et les gènes codant pour les *leucocyte adhesion molecules* (LAMs) tels que *Inter-Cellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1), *Alcam* et *Lgals3*. Les conclusions de l'étude, en relation avec le déroulement des événements observés lors du développement, ont mené les auteurs à proposer une nouvelle séquence d'événements menant à la formation de la BHE, dans laquelle les premières cellules à intervenir sont les progéniteurs neuraux, précédant l'action des péricytes. Enfin, les astrocytes termineraient le processus en induisant l'expression des gènes spécifiques de la BHE, notamment l'expression des pompes d'efflux (Figure 17).

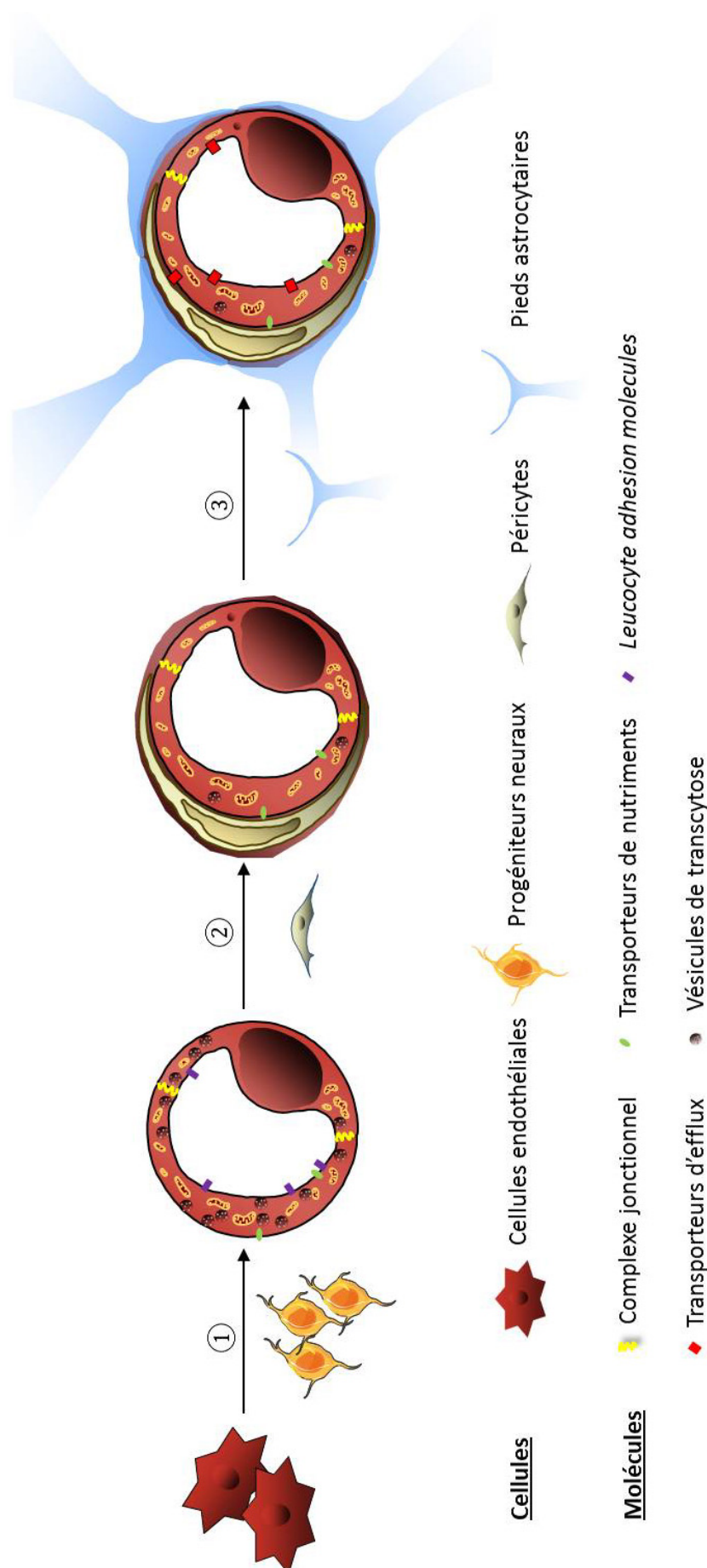


Figure 17 – **Modèle des interactions cellulaires mises en jeu lors de la formation de la BHE, selon les hypothèses émises par Daneman *et al.* (2010).**

① Lors de l'angiogenèse embryonnaire, les progéniteurs neuraux induisent l'expression de certaines protéines spécifiques de la BHE, dont les protéines des jonctions serrées et des transporteurs de nutriments, au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux.

② Ensuite les péricytes, recrutés pendant les phénomènes angiogéniques, renforcent la « pré-barrière » en régulant la structure des jonctions serrées, en limitant les phénomènes de transcytose et en inhibant l'expression des LAMs.

③ Enfin, les astrocytes formés lors de la gliogenèse, achèvent la formation et régulent les fonctions de la BHE après la naissance.

1.5.3 Les neurones

Jusqu'à présent le rôle des neurones dans l'induction des propriétés de la BHE a été relativement ignoré. La formation des jonctions serrées est une des caractéristiques les plus précocement présentées par les cellules endothéliales cérébrales lors du développement de la BHE : les jonctions serrées se forment lorsque les vaisseaux sanguins envahissent le cerveau à E11 chez la souris et E12 chez le rat (Daneman *et al.*, 2010), alors que la gliogenèse ne commence pas avant E17 pour se terminer en période post-natale. C'est pourquoi certains auteurs ont suggéré que la formation des jonctions serrées serait initiée par des neurones et/ou des cellules progénitrices cérébrales plutôt que par de la glie différenciée, au moins dans un premier temps (Daneman *et al.*, 2010; Saunders *et al.*, 2000).

Peu de données existent concernant le potentiel effet inducteur des neurones sur les cellules endothéliales, exception faite de quelques études menées *in vitro*. Ainsi, Tontsch et Bauer (1991) ont montré que des cellules endothéliales de capillaires cérébraux cocultivées avec des neurones ou cultivées en présence de membranes plasmiques neuronales présentent une activité γ -GT supérieure à celle obtenue en coculture avec des astrocytes. En outre, dans une lignée de cellules endothéliales de rat (RBE4), il a été démontré que ni les astrocytes ni le collagène de type IV (constituant de la matrice extracellulaire) ne pouvaient induire l'expression de l'occludine au sein des cellules endothéliales si elle n'étaient pas mises en contact avec des cellules neuronales (Savettieri *et al.*, 2000; Schiera *et al.*, 2005). Une autre étude impliquant une coculture de cellules endothéliales cérébrales et de progéniteurs neuraux démontra que ces derniers induisaient une diminution de la perméabilité paracellulaire et une augmentation de la résistance électrique, suggérant l'induction du phénotype de BHE au niveau des cellules endothéliales (Weidenfeller *et al.*, 2007).

Toutefois, les intercommunications entre les neurones et les cellules endothéliales de la BHE connaissent un intérêt croissant depuis l'émergence du concept d'unité neurovasculaire (Iadecola, 2004), basé sur les liens étroits existant entre la régulation de la circulation cérébrale et l'activité des cellules environnantes, liens qui pourraient être affectés dans un grand nombre de pathologies cérébrales. Étant donnée la nature dynamique de l'activité neuronale et des besoins métaboliques du tissu nerveux, la microcirculation cérébrale doit être fortement sensible aux besoins du tissu qu'elle approvisionne (Paemeleire, 2002). D'ailleurs les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales et les prolongements astrocytaires sont contactés par des terminaisons nerveuses noradrénergiques, sérotoninergiques, cholinergiques et acide γ -amino butyrique (GABA)-ergiques (Hawkins et Davis, 2005), soulignant les relations étroites existant entre les différents acteurs de l'UNGV.

Le fait que les neurones puissent avoir une influence sur le développement de la BHE n'a donc pas été établi, mais ils semblent pouvoir réguler certains aspects de sa formation et de sa fonction.

1.5.4 La membrane basale des capillaires cérébraux

La membrane basale des capillaires cérébraux est une matrice extracellulaire spécialisée produite par les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes. Au niveau de la BHE adulte, elle forme un réseau extracellulaire continu d'une épaisseur de 30 à 40 nm, composée principalement de collagène de type IV, de laminines et de nidogène (Engelhardt et Sorokin, 2009). Sa structure en réseau et la présence de charges anioniques lui confèrent des propriétés de filtre sélectif qui viennent s'ajouter à celles de l'endothélium cérébral. En plus de son rôle structural, des études réalisées *in vitro* montrent que les composants de la membrane basale influencent l'expression des protéines des jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales (Tilling *et al.*, 1998). De plus, la perte de la stabilité de la membrane basale sous l'effet de métalloprotéases ou de collagénases est fréquemment observée dans les manifestations pathologiques à l'origine de la rupture de la BHE (Gasche *et al.*, 2006), suggérant son importance dans le maintien des propriétés de cette barrière.

L'endothélium des capillaires cérébraux présente donc des caractéristiques qui le différencient des endothélia périphériques : la présence de complexes jonctionnels scellant l'espace intercellulaire, l'absence de fenestration, la rareté du transport vésiculaire mais aussi l'expression d'enzymes et de pompes d'efflux restreignant le passage de nombreuses molécules. Toutes ces caractéristiques font de cet endothélium le siège de la BHE, qui protège le parenchyme cérébral de composés potentiellement toxiques présents dans le sang tout en régulant efficacement les échanges entre le compartiment sanguin et le compartiment cérébral. Les modes de transport autorisés au niveau de la BHE sont ainsi majoritairement spécifiques, servant principalement à l'approvisionnement du cerveau en nutriments essentiels à son fonctionnement. La formation, la différenciation et les modalités de fonctionnement de l'endothélium cérébral sont sous le joug d'autres types cellulaires du compartiment vasculaire (péricytes) et parenchymateux (cellules gliales et neurones). Pour étudier cette structure complexe plusieurs possibilités s'offrent aux scientifiques : les modèles *in vivo*, *in vitro* et *in silico*. Une grande partie des études consacrées à la BHE, étant données ses caractéristiques restrictives, visent à étudier, prédire ou optimiser le passage de composés à travers elle ou à estimer son intégrité : la partie suivante développera principalement les modèles destinés à répondre à ces questions en particulier.

Les modèles d'étude de la BHE

Sommaire

2.1	Les modèles <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	49
2.1.1	Les méthodes d'études invasives	49
2.1.2	Les méthodes d'études non invasives (techniques d'imagerie)	53
2.2	Les modèles <i>in vitro</i>	57
2.2.1	Les microvaisseaux cérébraux isolés	57
2.2.2	Les modèles cellulaires	57
2.2.3	Les modèles non cellulaires	75
2.3	Les modèles <i>in silico</i>	76

ÉTANT DONNÉES l'importance et la complexité de la BHE dans le maintien de l'homéostasie cérébrale, la compréhension de la biologie de cette structure en conditions physiologiques et pathologiques constitue un enjeu majeur en recherche fondamentale. De plus l'industrie pharmaceutique a, quant à elle, un grand intérêt à prendre en compte la BHE dans le cadre du développement de médicaments, puisqu'elle est connue pour empêcher un grand nombre de molécules d'atteindre le parenchyme cérébral. La nécessité d'étudier cette structure a conduit à la mise en place de différents modèles de BHE permettant de caractériser ses propriétés, les mécanismes cellulaires et moléculaires et les phénomènes de régulation mis en jeu au sein de cette structure en conditions physiologiques et pathologiques, d'étudier ou de prédire sa perméabilité vis-à-vis de diverses molécules... Les enjeux sont multiples ; les modèles existants le sont aussi. En fonction de l'objectif poursuivi, les modèles disponibles feront l'objet d'un choix judicieux, prenant en considération les avantages et les inconvénients de chacun. Ces modèles peuvent être basés sur l'utilisation d'animaux (études *in vivo*), de tissus (études *ex vivo*), de cellules (études *in vitro*) ou encore de modèles mathématiques pour la prédiction du passage de molécules (études *in silico*).

2.1 Les modèles *in vivo* et *ex vivo*

2.1.1 Les méthodes d'études invasives

2.1.1.1 La perfusion intraveineuse

Une des premières méthodes employées pour l'évaluation du passage d'un composé à travers la BHE consiste simplement à injecter par voie intra-veineuse un bolus de concentration connue de ce composé marqué chez un animal (rat ou souris généralement) (Figure 18A). Suite à cette injection unique des échantillons sanguins sont prélevés, et l'animal est décapité afin de mesurer la quantité de molécules ayant atteint le tissu cérébral (Mayer *et al.*, 1959). Le passage cérébral de la molécule est apprécié par le rapport des concentrations cérébrales et systémiques mesurées. Une cinétique de passage du composé dans le compartiment cérébral peut être établie en sacrifiant des animaux à des temps variables après l'injection. Facile à mettre en œuvre, cette technique permet une évaluation préliminaire rapide du passage d'un composé à travers la BHE sans avoir besoin de chirurgie lourde, mais nécessite l'utilisation d'un grand nombre d'animaux. Il faut souligner que les données obtenues à l'aide de cette méthode résultent non seulement de la perméabilité endothéliale des composés, mais également de leur éventuel métabolisme par les organes périphériques ou de leur fixation aux protéines plasmatiques.

2.1.1.2 L'indice d'absorption cérébrale ou *brain uptake index* (BUI)

Cette technique est basée sur l'injection d'un bolus du composé d'intérêt dans l'artère carotide, permettant de s'affranchir de la métabolisation de la molécule par les organes périphériques (Figure 18B). Décrite pour la première fois par Oldendorf (1970), cette méthode consiste à injecter simultanément dans l'artère carotide le composé radioactif testé et une molécule de référence (elle aussi radioactive), sachant que cette dernière est connue pour passer facilement la BHE. Par exemple, un composé marqué au ^3H peut être co-injecté avec une molécule de référence radiomarkée au ^{14}C . Après mesure des concentrations cérébrales et plasmatiques des composés test et de référence, la valeur du *brain uptake index* (BUI) de la substance test sera calculée selon la formule :

$$\text{BUI (\%)} = \frac{[^{14}\text{C}]_{\text{cerveau}} / [^3\text{H}]_{\text{cerveau}}}{[^{14}\text{C}]_{\text{injecté}} / [^3\text{H}]_{\text{injecté}}} \times 100 \quad (2.1)$$

Comme pour l'injection intra-veineuse, il est possible d'établir une cinétique en réalisant les prélèvements à des temps variables. Cette méthode, aisée à mettre en œuvre, reste cependant peu sensible pour les composés à faible perméabilité car la mesure se fait suite à un seul passage au contact des capillaires cérébraux. De plus, la dose totale injectée n'atteint pas l'ensemble du cerveau : seuls 20% de la quantité de composé injectée entrent dans l'artère carotide interne, les 80% restants atteignant l'artère carotide externe (Mensch *et al.*, 2009).

A l'inverse, on peut estimer l'efflux d'une molécule du parenchyme cérébral vers la circulation et ainsi déterminer son *brain efflux index* (BEI). Sur le même modèle que pour la détermination du BUI, le composé à étudier est injecté avec une molécule de référence mais cette fois-ci au niveau cérébral, puis son efflux est quantifié. Puisque la quantité de composé efflué dans le sang est difficilement dosable, l'évaluation se fait de préférence en mesurant la quantité restante au niveau cérébral (Kusuhara *et al.*, 2003). La formule permettant de calculer le BEI est donc la suivante :

$$\text{BEI (\%)} = \left(1 - \frac{[^{14}\text{C}]_{\text{cerveau}} / [^3\text{H}]_{\text{cerveau}}}{[^{14}\text{C}]_{\text{injecté}} / [^3\text{H}]_{\text{injecté}}}\right) \times 100 \quad (2.2)$$

2.1.1.3 La perfusion cérébrale *in situ*

La technique de perfusion cérébrale *in situ* (ou de perfusion de l'artère carotide interne) est une amélioration de la méthode de BUI, puisqu'elle oblige la totalité du perfusé à emprunter la circulation sanguine cérébrale. En effet dans ce cas il y a cathétérisation rétrograde de l'artère carotide ex-

terne de l'animal anesthésié, et ligature de toutes les branches des artères carotides interne et externe (Takasato *et al.*, 1984) (Figure 18C). Cette méthode - techniquement plus ardue que les précédentes à cause de l'intervention chirurgicale - n'en demeure pas moins très intéressante car elle permet, en faisant varier la composition du perfusat (solution saline, plasma, sang artificiel), d'étudier les effets d'un large éventail de facteurs tels que le pH, la pression osmotique, la présence de protéines ou de cellules sur le passage du composé à travers la BHE. Cette méthode a récemment été simplifiée en cathétérisant l'artère carotide commune et en stoppant le flux sanguin endogène en sectionnant les ventricules cardiaques avant le début de la perfusion, afin de minimiser le mélange du perfusat au sang endogène (Smith et Allen, 2003).

2.1.1.4 La microdialyse intracérébrale

La microdialyse intracérébrale mise au point plus récemment (Aasmundstad *et al.*, 1995; Westergren *et al.*, 1995) nécessite l'implantation d'une sonde dans le parenchyme cérébral d'un animal (Figure 18D). Cette sonde comprend une membrane semi-perméable, et est irriguée par une solution physiologique (perfusat). Ce système permet, suite à l'administration d'un composé par voie intraveineuse, d'étudier la quantité de ce composé ayant pénétré dans le parenchyme cérébral, puisqu'il va diffuser à travers la membrane de la sonde. Toute molécule dont la taille est inférieure au « cut-off » de la membrane pourra la traverser librement. Le milieu de perfusion est renouvelé continuellement, permettant le recueil des échantillons (constitués par le dialysat obtenu) à différents temps pour réaliser une cinétique complète chez un même animal. La concentration de la molécule d'intérêt pourra être dosée selon la méthode analytique appropriée, limitée uniquement par sa sensibilité. Contrairement aux techniques précédemment décrites, celle-ci limite le nombre d'expérimentations et donc d'animaux nécessaires. Les inconvénients de cette méthode résident principalement dans la variabilité des résultats selon la localisation de la sonde, et dans la mise en place de cette dernière. Le procédé est techniquement difficile et invasif, il peut d'ailleurs entraîner des dommages traumatiques (y compris au niveau de la BHE) et des processus inflammatoires. La variabilité des résultats selon la localisation de la sonde peut aussi être considérée comme un avantage si l'expérimentateur a intérêt à cibler sa molécule sur une zone cérébrale particulière.

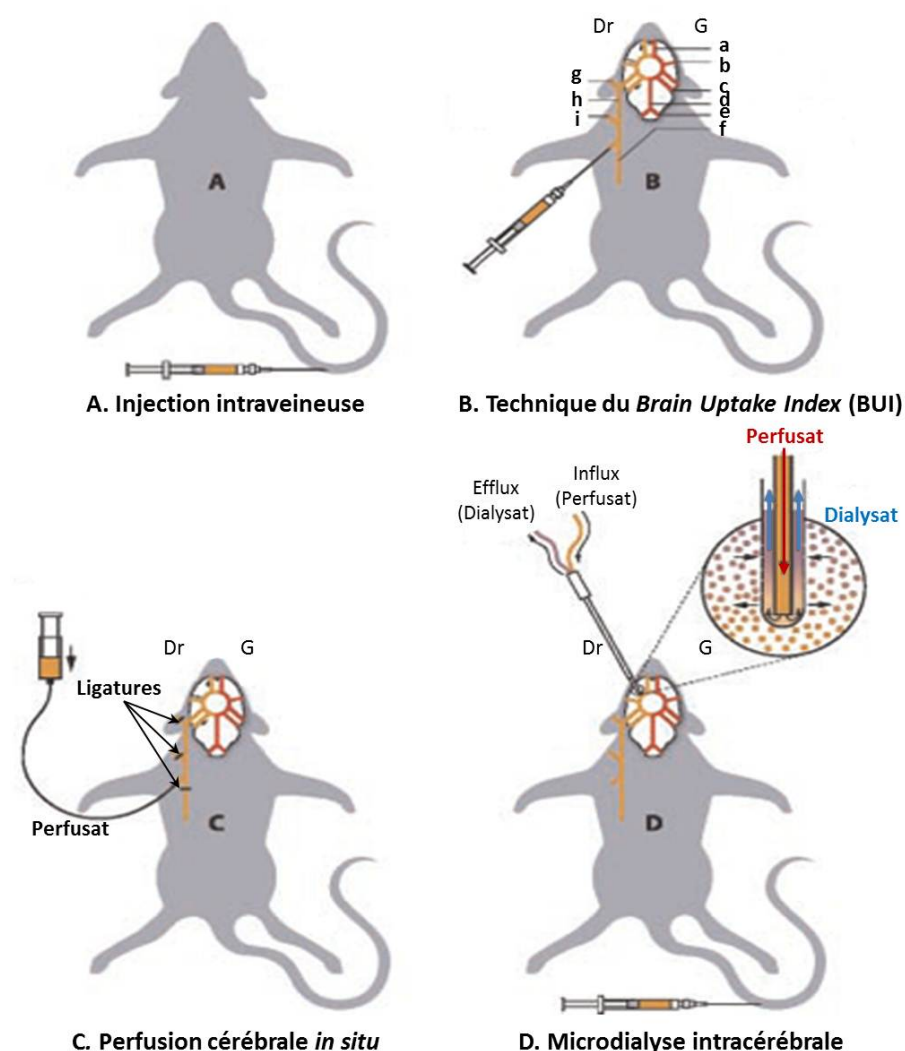


Figure 18 – Les principales techniques d'étude de la pénétration cérébrale de molécules *in vivo*. Modifié de Mensch *et al.* (2009).

A. L'injection intraveineuse du composé d'intérêt est souvent réalisée au niveau de la queue du rongeur.

B. La technique du *brain uptake index* (BUI) implique l'injection directe du composé étudié dans l'artère carotidienne.

C. La perfusion cérébrale *in situ* nécessite la ligature des branches internes et externes de l'artère carotidienne (voire de l'artère ptérygo-palatine), permettant à l'ensemble du perfusé d'emprunter la circulation sanguine cérébrale.

D. La microdialyse intracérébrale dépend de la mise en place d'une sonde dans le parenchyme cérébral de l'animal, permettant de mettre en contact une solution physiologique et le milieu extracellulaire cérébral, alors séparés par une membrane microporeuse. La solution perfusée dans la sonde (perfusé) entre alors en contact avec le milieu extracellulaire et les molécules capables de traverser la membrane feront partie du dialysat, dont la composition sera analysée. Tout composé injecté à l'animal, qui pénètre le parenchyme cérébral et dont la taille lui permet de traverser la membrane de la sonde pourra ainsi être retrouvé dans le dialysat. Sa concentration pourra être déterminée au cours d'une cinétique.

a. Artère cérébrale antérieure b. Artère cérébrale moyenne c. Artère cérébrale postérieure d. Artère basilaire e. Artère vertébrale f. Artère carotide commune g. Artère ptérygo-palatine h. Artère carotide interne i. Artère carotide externe

2.1.1.5 L'autoradiographie quantitative

L'autoradiographie quantitative nécessite l'injection d'une molécule radioactive à un animal, puis le recueil d'échantillons sanguins artériels et de coupes cérébrales de 20 μm d'épaisseur. Les échantillons sanguins servent à doser la concentration sanguine du composé en question (à différents temps si des collectes sont réalisées périodiquement) ; les coupes de cerveau sont congelées puis autoradiographiées. Après développement du film autoradiographique, la distribution et la quantification du signal radioactif sont déterminées par analyse d'images.

D'autres méthodes d'étude de la BHE *in vivo* - quant à elles non invasives - ont été développées, permettant ainsi d'étendre leur utilisation à l'homme.

2.1.2 Les méthodes d'études non invasives (techniques d'imagerie)

2.1.2.1 La tomographie par émission de positrons (ou positons)

La tomographie par émission de positrons (TEP) correspond à une technique d'imagerie fonctionnelle non invasive pouvant être utilisée chez l'Homme (à l'aide d'un TEP-scan) ou chez l'animal (à l'aide d'un micro-TEP-scan). Elle nécessite l'injection d'un radionucléide émettant des positons ou d'un composé test marqué avec un isotope émettant des positons. Selon l'objectif de l'étude, différents traceurs sont utilisés :

- l'imagerie de perfusion cérébrale utilise du CO_2 ou de l' H_2O marqués à l'Oxygène 15
- l'imagerie métabolique utilise des analogues du glucose (tel le déoxyglucose marqué au Fluor 18) ou d'acides aminés (tels que la méthionine marquée au Carbone 11)
- l'imagerie des récepteurs (ou transporteurs) implique l'injection de leurs ligands (ou substrats) marqués. Dans le cadre de l'étude des transporteurs au sein de la BHE, des substrats de la P-gp marqués ont permis d'étudier l'activité de cette pompe d'efflux chez l'Homme (Sasongko *et al.*, 2005) et chez les primates (Takashima *et al.*, 2011).
- enfin, l'étude de l'intégrité de la BHE nécessite l'injection de traceurs, tels que le ^{68}Ga -acide éthylène diamine tétracétique (EDTA), qui ne la traversent pas en conditions physiologiques. Seule une BHE lésée laissera le marqueur s'extravaser dans le parenchyme cérébral (Kessler *et al.*, 1984), dévoilant les zones dont la BHE est perméable.

Suite à l'injection intraveineuse du radio-traceur, le sujet est placé dans le TEP-Scan qui va détecter les photons très énergétiques émis lors de la destruction des positrons (Figure 19), permettant d'apprécier la distribution du traceur dans le cerveau en temps réel avec une résolution spatiale de grand intérêt. En effet, les techniques de reconstruction d'images associées permettent de représenter le cerveau en une série de coupes contiguës en temps réel, et donc d'observer la cinétique d'entrée du traceur au niveau cérébral ; la perméabilité de la BHE pour le composé étudié peut d'ailleurs être calculée (Huang *et al.*, 1998).

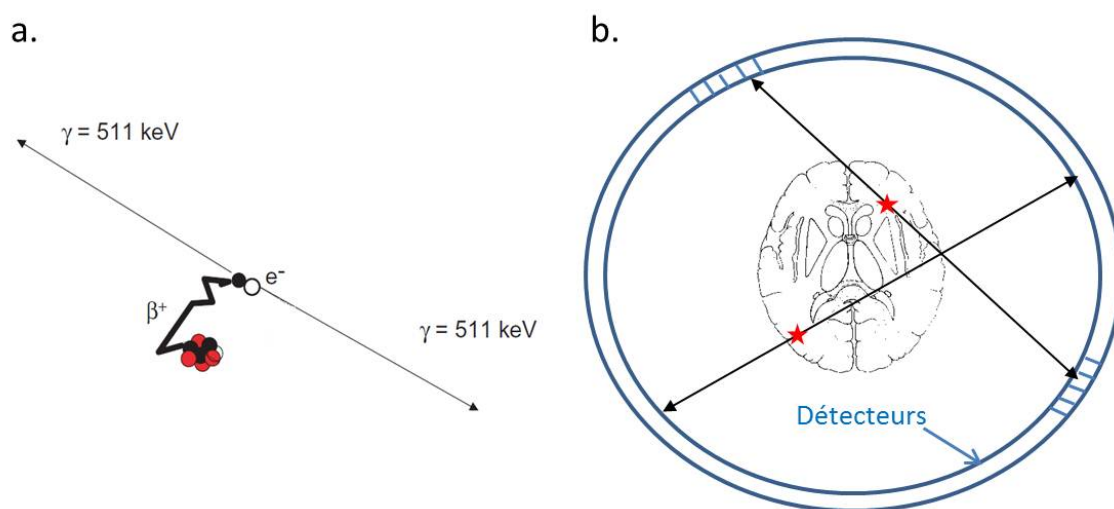


Figure 19 – **Principe de la TEP.** Modifié de Mazoyer (2002). **a. Désintégration du positon et réaction d'annihilation.** Le composé qui sera suivi grâce à cette technique doit être un radionucléide ou un composé test marqué avec un isotope émettant des positons. Une fois émis, un positon (β^+) parcourt quelques millimètres dans les tissus, où il perd toute son énergie cinétique. Quand le positon est pratiquement au repos, il interagit avec un électron (e^-) du milieu, suivant une réaction d'annihilation au cours de laquelle la masse des deux particules se transforme en deux photons γ de 511 keV, émis dans des directions opposées. **b. Dispositif de détection.** La TEP repère les photons qui ont été émis simultanément à 180 °C. Ces photons γ sont si énergétiques qu'ils traversent la boîte crânienne et sont donc détectés par la caméra à positons cylindrique qui entoure la tête du sujet : la paroi interne de l'appareil est recouverte de détecteurs. Lorsqu'une paire de ces photons arrive simultanément sur deux détecteurs opposés (on parle de *coïncidence*), on admet qu'ils sont issus de la dématérialisation d'un même positon, qui se trouve alors sur la droite joignant les deux détecteurs. L'analyse mathématique subséquente permet de déterminer précisément les points de désintégration, et la reconstruction d'image permet de visualiser la répartition des positons (★) au sein du cerveau.

La TEP est considérée comme une méthode *in vivo* très puissante pour obtenir de nombreuses informations, notamment biochimiques, tout en étant non invasive, rapide, reproductible et très sensible. Son usage reste cependant limité en raison de la demi-vie très courte des radio-éléments utilisés et de son coût prohibitif. Un autre désavantage de cette méthode est qu'elle ne permet pas de distinguer le composé-parent de ses métabolites éventuels, ni de la fraction libre de la fraction liée du radio-élément (Mensch *et al.*, 2009).

2.1.2.2 L'imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie médicale de très grande précision qui - contrairement à d'autres techniques d'imagerie comme la TEP - n'implique pas d'irradiation, mais s'appuie sur le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN). Elle se base sur l'observation de la RMN des protons de l'eau contenus dans l'organisme, c'est-à-dire la réponse des noyaux d'hydrogène de l'eau soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique. Cette méthode utilise donc les propriétés intrinsèques des tissus, et notamment leur contenu en eau, mais nécessite tout de même l'utilisation d'agents de contraste qui permettent d'augmenter l'intensité des signaux et donc facilitent la visualisation des contrastes, qui permettent par exemple de révéler les tissus lésés et les tumeurs.

Cette méthode très sensible permet en particulier de détecter et d'observer la progression des lésions de la BHE qui interviennent dans de nombreuses affections cérébrales telles que la sclérose en plaques et les accidents vasculaires cérébraux (AVCs). Les optimisations récentes de la technique et la disponibilité de scanners à très haute performance ont permis de développer des méthodes non-invasives avec une très haute résolution spatiale pour quantifier et localiser les lésions de la BHE (Kassner et Thornhill, 2011). Ceci implique généralement l'administration intraveineuse d'agents de contrastes contenant du Gadolinium (tels que le ^{64}Gd -acide diéthylène triamine penta acétique, 550 Da). Cet agent de contraste traverse la BHE lésée, permettant de visualiser les zones perméabilisées (Figure 20). La quantification de la perméabilité de la BHE se base sur la méthode d'analyse graphique décrite par Patlak *et al.* (1983). Cette technique est facilement utilisable chez l'Homme, et des appareillages similaires ont été mis au point pour l'IRM sur petit animal.

Le développement de l'IRM multiparamétrique permet aujourd'hui de déterminer non seulement le taux de transfert d'un agent de contraste du sang vers le parenchyme mais aussi d'étudier en même temps des paramètres complémentaires comme le flux sanguin cérébral ou le transfert de magnétisation, reflétant les dysfonctions tissulaires et vasculaires (Nagaraja *et al.*, 2011). De plus, Iqbal *et al.* (2011) ont décrit une méthode consistant à encapsuler un médicament (dans leur exemple la doxorubicine, une anthracycline peu lipophile et substrat des pompes d'efflux) dans des liposomes intégrant à la fois un agent de contraste et un anticorps, qui assure la transcytose médiée par récepteur des liposomes à travers la BHE. De cette manière la technique d'imagerie associée peut à la fois permettre de visualiser le passage d'un médicament encapsulé dans le parenchyme cérébral et de quantifier son transport à travers la BHE de manière non-invasive.

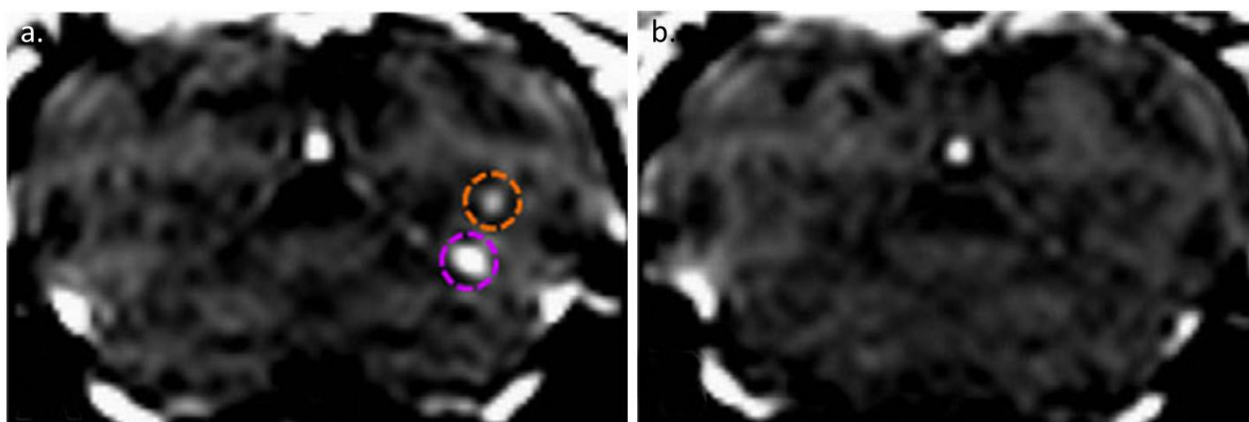


Figure 20 – Images par résonance magnétique pondérées en T1 d'une coupe cérébrale coronale d'un primate soumis à des ultrasons focalisés. Extrait de Marquet *et al.* (2011). **a.** Les ultrasons focalisés permettent une ouverture localisée de la BHE, correspondant aux zones encadrées d'orange et de violet. Ces zones indiquent la pénétration de l'agent de contraste dans le parenchyme cérébral, permise par l'ouverture de la BHE. **b.** Une semaine après application des ultrasons, l'IRM obtenue après injection de l'agent de contraste ne révèle plus de zone perméable, démontrant que l'ouverture de la BHE induite par les ultrasons est transitoire.

Les méthodes *in vivo* qui viennent d'être décrites permettent donc d'étudier le passage de molécules à travers la BHE et/ou l'intégrité de cette barrière. En particulier les méthodes non invasives sont applicables à l'Homme, mais leur utilisation reste limitée ; elles ont un coût élevé, nécessitent l'utilisation de matériel de pointe, et dépendent parfois de la disponibilité de composés particuliers (molécules radioactives ou couplées au Gadolinium par exemple). Elles permettent en revanche l'étude de l'intégrité de la BHE en conditions pathologiques chez l'Homme, ce qui est d'un intérêt majeur en médecine. Elles apparaissent cependant lourdes lorsqu'il s'agit d'étudier le transport de molécule à moyen ou haut débit. De plus, l'étude des interactions cellulaires et moléculaires au sein de la BHE sont difficiles voire impossibles à appréhender *in vivo*, d'où la nécessité de développer des modèles d'études plus maniables avec un meilleur rendement, tels que des modèles *in vitro*.

2.2 Les modèles *in vitro*

2.2.1 Les microvaisseaux cérébraux isolés

Les microvaisseaux cérébraux isolés ont depuis longtemps été utilisés pour l'étude des propriétés de la BHE (Joó, 1985). La première méthode d'isolement, développée chez le rat, consistait à dissocier mécaniquement le tissu cérébral en le forçant au travers de tamis en nylon de mailles variables, puis à purifier la préparation par centrifugation (Joó et Karnushina, 1973). Des capillaires ont ensuite été extraits de nombreuses espèces (animaux ou humains) et selon différentes méthodes (purement mécaniques, combinant isolement mécanique et enzymatique, voire selon une procédure uniquement enzymatique) (Pardridge, 1998).

Les microvaisseaux isolés présentent l'avantage d'être très proches des conditions *in vivo*, puisqu'ils conservent leur intégrité structurale (Shivers *et al.*, 1984), sont métaboliquement actifs (Brendel *et al.*, 1974) et présentent un profil d'expression génique des transporteurs et récepteurs proches de l'*in vivo* (Bickel, 2005). Ils représentent donc un modèle de choix pour l'étude des propriétés de la BHE ; ils ont permis de mettre en évidence des propriétés fondamentales des cellules endothéliales telles que la présence de transporteurs et l'existence d'une polarité de la BHE (Pardridge, 1998).

Les microvaisseaux isolés souffrent cependant d'un découplage des chaînes respiratoires mitochondriales (Lasbennes et Gayet, 1984) qui limite leur fenêtre d'utilisation et peut induire une baisse d'activité de certains transports. De plus, le compartiment luminal étant difficile d'accès, les études de transport à travers la BHE ne peuvent s'effectuer qu'à partir du compartiment cérébral (Miller *et al.*, 2000).

2.2.2 Les modèles cellulaires

L'isolement de microvaisseaux cérébraux par Joó et Karnushina (1973) a ouvert la voie à l'extraction de cellules endothéliales microvasculaires de diverses espèces. Les modèles basés sur des cultures cellulaires nécessitent l'utilisation de matrices et de milieux de culture spécifiques permettant la croissance de ces cellules. Bien que les techniques d'isolement des cellules et de préparation des modèles se basent toutes sur le même principe, les procédures utilisées varient d'un laboratoire à l'autre (Deli *et al.*, 2005).

2.2.2.1 Les cultures endothéliales (ou épithéliales) à la base des modèles *in vitro* de BHE

Isolement et mise en culture des cellules endothéliales cérébrales. Plusieurs protocoles ont été mis au point afin d'obtenir des cultures de cellules endothéliales cérébrales, avec de nombreuses variantes selon l'espèce considérée et le laboratoire d'investigation. Toutes les méthodes suivent cependant un schéma général selon plusieurs étapes : homogénéisation du tissu cérébral, isolement des microvaisseaux puis isolement et mise en culture des cellules endothéliales issues de ces microvaisseaux (Figure 21).

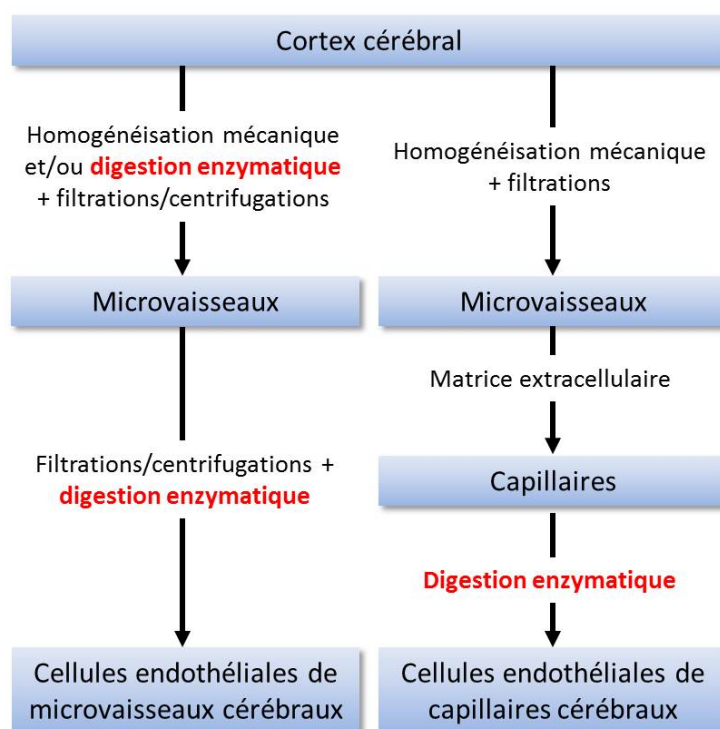


Figure 21 – Les deux principales procédures d'isolement de cellules endothéliales à partir de microvaisseaux (à gauche) et de capillaires cérébraux (à droite). Adapté de [Cecchelli et al. \(2006\)](#).

L'isolement des microvaisseaux du tissu environnant nécessite d'abord une dissociation mécanique et/ou enzymatique du tissu cérébral, puis une étape de filtration sur tamis. Si digestion enzymatique il y a, elle doit être réalisée avec soin pour éviter de surexposer les microvaisseaux cérébraux aux enzymes, ce qui peut engendrer une altération des isolats cellulaires qui en résulteront. Ils peuvent alors proliférer avec difficulté, en risquant d'obtenir une faible reproductibilité du phénotype des cellules endothéliales ainsi générées. La préparation microvasculaire obtenue comprend donc des artérioles, des veinules et des capillaires. Des étapes de filtrations supplémentaires et/ou de centrifugations différentielles en gradient permettent d'enrichir les préparations de microvaisseaux en capillaires ([Bowman et al., 1981](#); [Coisne et al., 2005](#); [Perrière et al., 2005](#)). Ces préparations

microvasculaires subissent alors une étape de digestion enzymatique permettant l'isolement des cellules endothéliales, à l'aide de diverses enzymes (collagénase et/ou dispase) (Figure 21, à gauche). Les cellules endothéliales ainsi obtenues peuvent alors être ensemencées.

L'inconvénient de cette procédure réside dans le fait que les cellules endothéliales obtenues proviennent de capillaires mais aussi d'artérioles et de veinules : même si la préparation microvasculaire est enrichie en capillaires elle est contaminée par des fragments de plus gros vaisseaux. Les cellules endothéliales issues de ces préparations proviennent donc de divers fragments vasculaires. Or, les profils d'expression génique des cellules endothéliales varient en fonction de leur provenance au sein de l'arborescence vasculaire (Chi *et al.*, 2003), et le phénotype de BHE disparaît progressivement parallèlement à l'augmentation du diamètre des vaisseaux (Song et Pachter, 2003). De plus, cette technique n'empêche pas la contamination des cellules endothéliales par d'autres types cellulaires (Abbott *et al.*, 1992), tels que les péricytes. Si ces derniers sont extraits avec les cellules endothéliales et contaminent la monocouche, ils peuvent induire une augmentation de la perméabilité endothéliale (Parkinson et Hacking, 2005). Pour cette raison des méthodes de sélection ont été développées. Par exemple, Perrière *et al.* (2005) sélectionne les cellules endothéliales de rat à l'aide de la puromycine : il s'agit d'une sélection positive des cellules exprimant la P-gp. En effet, cet agent pharmacologique est toxique pour les cellules qui ne peuvent l'effluer grâce à la P-gp. Celle-ci est présente sur les cellules endothéliales qui seront donc protégées, mais est sensée être absente (ou exprimée plus faiblement) au niveau des péricytes, qui mourront donc suite à ce traitement. D'autres techniques consistent à séparer les cellules endothéliales des contaminants grâce aux antigènes qu'elles expriment spécifiquement, à l'aide de la technique du *fluorescence activated cell sorting* (FACS) par exemple ou de billes recouvertes de lectines liant spécifiquement l'endothélium.

Une stratégie alternative permettant d'isoler des cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins a été mise au point par Méresse *et al.* (1989) (Figure 21, à droite) : elle consiste en une étape d'homogénéisation et de filtration permettant tout d'abord d'obtenir une préparation microvasculaire, qui est ensuite déposée sur une matrice extracellulaire liant sélectivement les capillaires cérébraux. Cette étape permet donc d'éliminer les autres types de microvaisseaux. Les cellules endothéliales migrant de ces capillaires forment alors des microcolonies, qui sont microtrypsines puis ensemencées dans des boîtes de Pétri recouvertes de gélatine. Des péricytes peuvent aussi migrer de ces fragments capillaires, mais dans des conditions de culture favorisant la croissance des cellules endothéliales, approximativement 20% des capillaires ainsi ensemencés génèrent des colonies en-

dothéliales dépourvues de péricytes (Méresse *et al.*, 1989). Cette méthode a l'avantage de permettre la culture de cellules endothéliales issues de capillaires, non contaminées par des cellules endothéliales issues de vaisseaux de plus gros diamètre. Les cellules endothéliales bovines ainsi obtenues peuvent être trypsinées et congelées en azote liquide pour utilisation/amplification ultérieure (après un premier passage, on parle de « culture secondaire »).

Les cellules endothéliales ainsi obtenues peuvent constituer des cultures dites primaires - ou secondaires si elles peuvent être amplifiées - voire être immortalisées pour donner des lignées endothéliales cérébrales, constituant la base des modèles *in vitro* de BHE.

Les cultures primaires et secondaires de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux.

Les cultures primaires de cellules endothéliales de capillaires cérébraux sont connues pour retenir beaucoup des caractéristiques de la BHE *in vivo*, bien qu'une partie d'entre elles puissent être régulées négativement voire perdues *in vitro* si elles ne sont pas réinduites.

Du fait de leur facilité d'obtention et de la grande quantité de cellules qu'ils peuvent fournir, les cerveaux bovins (Cecchelli *et al.*, 1999; Rubin *et al.*, 1991) et porcins (Franke *et al.*, 2000) sont devenus des sources de cellules endothéliales cérébrales très populaires, que ce soit dans le milieu académique ou industriel. De plus, la possibilité de les amplifier a permis la mise en place de cultures dites « secondaires », c'est-à-dire pouvant être maintenues après plusieurs passages. Les cellules endothéliales cérébrales bovines obtenues selon la méthode de Méresse *et al.* (1989) peuvent être utilisées du 3^{ème} au 7^{ème} passage, et possèdent donc un rendement intéressant.

Le rendement associé à l'extraction de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux murins est relativement faible, mais des modèles *in vitro* de BHE utilisant leur culture primaire ont été développés (Abbott *et al.*, 1992; Coisne *et al.*, 2005; Ichikawa *et al.*, 1996; Shayan *et al.*, 2011; Song et Pachter, 2003). Ces modèles sont en effet intéressants puisque de nombreux modèles pathologiques ont été obtenus chez le rat et la souris, qui sont des espèces largement répandues dans les études menées *in vivo* et pour lesquels de nombreux outils moléculaires sont disponibles.

L'accès difficile aux tissus humains rend la mise en place de cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales humaine très délicate. En effet, un approvisionnement régulier n'est pas envisageable. Quand des tissus peuvent être obtenus, ils proviennent souvent de biopsies effectuées chez des patients atteints de pathologies diverses (épilepsie, tumeurs cérébrales) (Bernas *et al.*, 2010) : il y a une forte variabilité concernant la qualité des prélèvements, aucune standardisation n'est donc possible. Malgré ces inconvénients, des cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales humaines

ont été mises en place (Bernas *et al.*, 2010; Biegel *et al.*, 1995; Cayrol *et al.*, 2011; Dorovini-Zis *et al.*, 1991). Les modèles humains peuvent s'avérer très utiles quand des aspects immunologiques et pathologiques doivent être considérés, et aussi du fait des différences d'expression de certains transporteurs existants entre l'Homme et d'autres espèces (Warren *et al.*, 2009). D'autres espèces ont aussi été utilisées pour extraire des cellules endothéliales cérébrales, comme le macaque (MacLean *et al.*, 2002) ou le chat (Fletcher *et al.*, 2006), mais sont beaucoup moins usitées dans le cadre de la mise en place de modèles de BHE.

Ces cultures primaires et secondaires retiennent beaucoup de caractéristiques de la BHE *in vivo* (marqueurs endothéliaux, expression polarisée de transporteurs, expression d'enzymes et de récepteurs, présence de jonctions serrées), mais leur mise en place et leur maintien demandent du temps et de nombreuses ressources techniques. Dans le but de développer des alternatives aux cultures primaires, des lignées cellulaires ont été établies.

Les cellules endothéliales cérébrales immortalisées. Pour pallier aux inconvénients inhérents à l'utilisation de cultures primaires, des lignées endothéliales d'origine cérébrale ont été développées selon différentes méthodes d'immortalisation (Gumbleton et Audus, 2001). De nombreux laboratoires académiques ont ainsi mis au point des lignées endothéliales cérébrales issues d'espèces variées (humain, rat, souris, boeuf et porc principalement), aujourd'hui plus ou moins bien caractérisées (Tableau 2).

Ces lignées ont été utilisées pour mettre en place des modèles *in vitro* de BHE, mettant à profit leur facilité de culture et la grande quantité de matériel qu'elles fournissent, à l'instar des cultures primaires précédemment citées. On leur attribue une bonne reproductibilité, mais elles forment des modèles présentant une perméabilité paracellulaire relativement élevée, rendant délicate leur utilisation dans le cadre d'études de transport de petites molécules à travers la BHE, malgré des essais d'optimisation de leur culture. Elles sont en revanche utiles dans d'autres cadres (études physiopathologiques, études concernant l'expression et la régulation de transporteurs et pompes d'efflux) selon les caractéristiques que chacune arbore.

Parmi elles, la lignée RBE4 a été intensivement caractérisée et étudiée (Roux et Couraud, 2005). Issue de cellules endothéliales cérébrales de rat immortalisées à l'aide d'un plasmide contenant le gène E1A de l'adénovirus (Roux *et al.*, 1994), cette lignée exprime de nombreuses caractéristiques de la BHE, telles que l'expression de la phosphatase alcaline, la γ -GT et la P-gp. Elles ont été utili-

sées avec succès dans différents types d'investigation : des études de transport (Faria *et al.*, 2010), de toxicité (dos Santos *et al.*, 2010), de localisation subcellulaire de transporteurs (Babakhanian *et al.*, 2007), de compréhension de voies de signalisation (Zhang *et al.*, 2009) et des cascades inflammatoires (Pan *et al.*, 2007) pour ne citer qu'elles.

Étant donnée la difficulté matérielle et éthique d'utiliser des cellules endothéliales cérébrales primaires humaines, le développement de lignées humaines s'est rapidement avéré indispensable, notamment au regard des variabilités inter-spécifiques rendant difficile l'extrapolation à l'Homme de données obtenues avec des cellules d'autres origines. Dans cette optique ont été développées différentes lignées de cellules endothéliales cérébrales humaines immortalisées (voir Tableau 2), dont la lignée hCMEC/D3 développée par Weksler *et al.* (2005). Ces cellules présentent des caractéristiques de la BHE comme l'expression de transporteurs d'efflux, et ont été utilisées dans de nombreuses études concernant les voies de signalisation (Fischer *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2008; Schreibelt *et al.*, 2007; Wilhelm *et al.*, 2007, 2008; Zhong *et al.*, 2008), et la régulation de l'expression de transporteurs (Carl *et al.*, 2010; Dauchy *et al.*, 2009; Zastre *et al.*, 2009). Une autre lignée humaine a été très récemment développée par Sano *et al.* (2010) par immortalisation à l'aide d'un antigène T du SV-40 sensible à la température, qui exprime l'occludine et la claudine-5 ainsi que divers transporteurs d'efflux et d'influx.

Un gros travail de mise au point, d'amélioration des propriétés de BHE et de caractérisation reste à faire sur ces lignées avant qu'elles ne deviennent une alternative réelle aux cultures primaires et secondaires dans le cadre des études de transport de molécules (Deli *et al.*, 2005). De plus, des aberrations chromosomiques ont été récemment reportées dans la lignée hCMEC/D3, démontrant l'instabilité génétique de ces cellules après un certain nombre de passages (Mkrtchyan *et al.*, 2009). Cependant, ces différentes lignées restent très intéressantes d'un point de vue rendement et facilité de culture, et peuvent être utiles si elles arborent les caractéristiques nécessaires à l'objectif poursuivi.

Les lignées cellulaires d'origine non cérébrale. Enfin, compte tenu de la facilité avec laquelle ces cellules sont cultivées et amplifiées, des lignées d'origine non cérébrale ont également été utilisées pour étudier la perméabilité de la BHE. Parmi ces lignées on trouve notamment des cellules épithéliales intestinales comme les Caco-2, ou rénales telles que les cellules *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK).

Nom	Espèce	Méthode de transformation	Référence
BB19	Humaine	Gène E6E7 du papillome humain	Prudhomme <i>et al.</i> (1996)
HBEC-51	Humaine	Antigène T du sv40	Xiao <i>et al.</i> (1996)
SV-HCEC	Humaine	Antigène T du sv40	Muruganandam <i>et al.</i> (1997)
HCEC	Humaine	Antigène T du sv40	Kannan <i>et al.</i> (2000)
HBMEC	Humaine	Antigène T du sv40	Stins <i>et al.</i> (2001)
hTERT-HBEC	Humaine	Gène de la télomérase humaine	Gu <i>et al.</i> (2003)
IHEC	Humaine		Sharp <i>et al.</i> (2003)
hCMEC/D3	Humaine	Gène de la télomérase humaine et Antigène T du sv40	Weksler <i>et al.</i> (2005)
TY08	Humaine	Antigène T du sv40	Sano <i>et al.</i> (2010)
MB114	Souris	Transformation spontanée	Hart <i>et al.</i> (1987)
MBEC(4)	Souris	Antigène T du sv40	Tatsuta <i>et al.</i> (1992)
MCEC	Souris	Antigène T du sv40	Xu <i>et al.</i> (1992)
S5C(4)	Souris	Gène E1A de l'Adénovirus	Wijsman et Shivers (1998)
TM-BBB4	Souris	Antigène T du sv40	Asaba <i>et al.</i> (2000)
bEND3	Souris	Antigène T du Polyomavirus	Omidi <i>et al.</i> (2003)
RCE-T1	Rat	Virus du sarcome de Rous	Mooradian et Diglio (1991)
RBE4	Rat	Gène E1A de l'Adénovirus	Roux <i>et al.</i> (1994)
CR-3	Rat	Antigène T du sv40	Lechardeur <i>et al.</i> (1995)
GP8(.3)	Rat	Antigène T du sv40	Greenwood <i>et al.</i> (1996)
GPNT	Rat	Antigène T du sv40	Regina <i>et al.</i> (1999)
RBEC1	Rat	Antigène T du sv40	Kido <i>et al.</i> (2000)
TR-BBB	Rat	Antigène T du sv40	Terasaki et Hosoya (2001)
rBCEC4	Rat	Antigène T du Polyomavirus	Blasig <i>et al.</i> (2001)
SV-BEC	Bovine	Antigène T du sv40	Durieu-Trautmann <i>et al.</i> (1991)
BBEC-SV	Bovine	Antigène T du sv40	Stins <i>et al.</i> (1997)
t-BBEC-117	Bovine	Antigène T du sv40	Sobue <i>et al.</i> (1999)
PBMEC	Porcine	Antigène T du sv40	Teifel et Friedl (1996)

Tableau 2 – Les différentes lignées endothéliales d'origine cérébrale décrites dans la littérature selon l'espèce, la méthode de transfection utilisée et la référence bibliographique décrivant leur mise au point.

Fréquemment utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour examiner l'absorption intestinale d'un composé, les cellules Caco-2 sont parfois également utilisées pour prédire le passage des composés dans le compartiment cérébral. Toutefois, les prédictions de perméabilité cérébrale obtenues sont qualitativement pauvres comparées à celles obtenues avec un modèle de cellules endothéliales de capillaires cérébraux en coculture avec des cellules gliales (Lundquist *et al.*, 2002).

Les mêmes observations ont été rapportées pour les cellules MDCK qui, bien qu'elles présentent une forte restriction du passage paracellulaire, expriment faiblement les transporteurs d'efflux comme la P-gp. Un clone de MDCK stablement transfecté avec le gène MDR1 humain codant pour la P-gp a d'ailleurs été proposé (Wang *et al.*, 2005), permettant d'identifier les composés qui sont substrats de cette pompe d'efflux. Étant donné le rôle émergeant de la BCRP dans les phénomènes d'efflux au niveau de la BHE, une lignée MDCK a récemment été transfectée à la fois avec les gènes codant pour la P-gp et la BCRP (Poller *et al.*, 2011), permettant de prendre en compte les deux pompes d'efflux majeures de la BHE avec le même support.

Bien qu'elles forment des monocouches de cellules dont les jonctions serrées scellent efficacement l'espace paracellulaire, ces lignées épithéliales présentent des différences morphologiques et structurelles fondamentales par rapport aux cellules endothéliales cérébrales, limitant considérablement leur utilisation en tant que modèles de BHE.

Les différents types de cultures de cellules endothéliales que nous venons de décrire constituent la base de la mise en place des modèles *in vitro* de BHE. Ces cellules peuvent êtreensemencées dans des boîtes de Pétri mais sont généralement cultivées à la surface de filtres, permettant l'étude de la perméabilité de la BHE ainsi formée et de les cocultiver avec d'autres populations cellulaires.

2.2.2.2 Les systèmes de culture sur filtre

Le premier système de culture sur filtre utilisé dans la mise en place d'un modèle de BHE fut fabriqué au début des années 60 par Bowman *et al.* (1983), à l'aide d'un maillage de nylon associé à une structure en polycarbonate. Depuis, une grande variété de systèmes filtrés de différentes tailles (surface de membrane de 0,143 à 44 cm²) et de porosité variable (pores de 0,4 à 8 µm de diamètre) ont été fabriqués dans divers matériaux (en polycarbonate, polyester, polytétrafluoroéthylène et polyéthylène téréphtalate).

Puisque les cellules endothéliales de la BHE présentent une polarisation, ce type de système permet de délimiter deux compartiments : le compartiment luminal au niveau du filtre, et le compar-

timent abluminal dans le puits sous-jacent (Figure 22). Cette structure permet aisément la coculture des cellules endothéliales avec d'autres types cellulaires, qui peuvent être cultivés sous le filtre ou au fond du puits. Ce système peut permettre une communication entre les cellules *via* des facteurs solubles et, selon la porosité du filtre, le transport à travers la BHE de molécules plus ou moins volumineuses - voire même le passage de cellules (Fazakas *et al.*, 2011) - pourra être étudié.

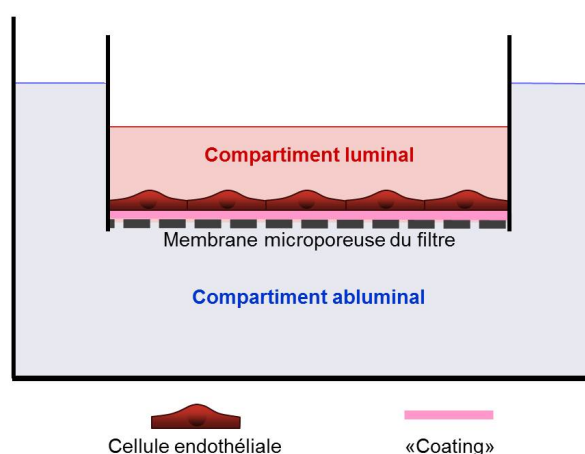


Figure 22 – **Schéma représentant les systèmes de culture sur filtre.** Les cellules endothéliales sont cultivées à la surface d'un filtre recouvert d'une matrice permettant leur adhérence et leur croissance (le « coating »). Le filtre comprend une structure rigide qui maintient la membrane microporeuse. Ce système, commercialisé sous différents formats, permet de cocultiver les cellules endothéliales avec d'autres cellules (ensemencées sous le filtre ou au fond du puits) et d'étudier le transport de molécules à travers la monocouche.

Ces systèmes ont permis la mise au point de nombreux modèles de BHE *in vitro*, comprenant des cellules endothéliales cultivées seules (soloculture) ou avec d'autres types cellulaires.

2.2.2.3 Évaluation des modèles *in vitro* de BHE : résistance électrique et perméabilité endothéliales

La qualité des modèles cellulaires de BHE est évaluée par la caractérisation des propriétés physiques et métaboliques de l'endothélium grâce aux différentes techniques de microscopie, de biologie moléculaire, et de biochimie. Ces différentes méthodes permettent de déterminer l'expression transcriptionnelle et/ou protéique des protéines de jonctions, des enzymes, des transporteurs et des récepteurs, de définir la qualité des jonctions et de mettre en évidence la fonctionnalité des transporteurs, récepteurs et enzymes exprimés.

La BHE est principalement caractérisée par sa faible perméabilité paracellulaire et par l'existence d'une perméabilité transcellulaire sélective ; l'évaluation de la qualité des modèles *in vitro* de BHE passe souvent en premier lieu par l'étude de la perméabilité paracellulaire endothéliale.

Deux techniques sont utilisées, la mesure de la résistance électrique trans-endothéliale - en anglais *transendothelial electric resistance* (TEER) - et la mesure directe de la perméabilité de l'endothélium.

Mesure de la TEER. La TEER est basée sur l'existence d'une faible perméabilité de la BHE aux ions, qui crée une résistance électrique d'autant plus forte que la perméabilité est faible. Sa mesure reflète la complexité (et donc la qualité) des jonctions serrées. Elle se mesure en Ohms, et s'exprime en fonction de la surface de la monocouche endothéliale (Ohms.cm^2). Il est difficile de définir ce qu'est une bonne valeur de TEER pour un modèle cellulaire de BHE *in vitro* car les mesures *in vivo* sont très difficiles, mais des résistances supérieures à 1.000 Ohms.cm^2 indiquent une TEER élevée. Cependant, les valeurs obtenues sont peu reproductibles d'un laboratoire à un autre, voire même au sein d'un même laboratoire (Deli *et al.*, 2005), rendant difficile la comparaison entre les modèles. Un même modèle peut même présenter des TEERS différentes selon l'appareillage utilisé : par exemple, le modèle de coculture développé par Dehouck *et al.* (1990) présente une TEER moyenne de 661 Ohms.cm^2 (mesurée avec le Milicell-ERS apparatus), alors que Boveri *et al.* (2005) trouvent sur ce même modèle une TEER moyenne de 358 Ohms.cm^2 avec le système de mesure de résistance EVOMTM de World Precision Instruments.

Mesure directe de la perméabilité de la monocouche endothéliale. La mesure de la perméabilité de l'endothélium permet entre autres de mettre en évidence la faible perméabilité endothéliale liée à la présence des jonctions serrées et constituant une des caractéristiques majeures de la BHE *in vivo*. Pour cela, le coefficient de perméabilité de la monocouche endothéliale est déterminé pour un marqueur d'intégrité, c'est-à-dire une molécule connue pour traverser faiblement la BHE. Il s'agit souvent d'une molécule hydrophile (par exemple le saccharose ou l'inuline radiomarqués, ou de composés fluorescents comme la fluorescéine ou le jaune Lucifer), qui ne doit pas être substrat ni d'un transporteur, ni d'une enzyme, ni d'un récepteur. La détermination de ce coefficient de perméabilité, le « Pe », se fait selon la technique décrite dans la Figure 23. Il s'exprime en cm/s ou cm/min . *In vivo*, les valeurs de perméabilité de la BHE pour le saccharose sont de l'ordre de 10^{-7} cm/s (Gumbleton et Audus, 2001).

On peut également utiliser cette technique pour mesurer le Pe de différentes molécules, dont les mécanismes de transport sont différents et qui passent plus ou moins bien à travers la BHE. La

comparaison des valeurs de perméabilité obtenues *in vitro* et *in vivo* permet de déterminer le degré de corrélation entre les deux méthodes, et donc d'évaluer la prédictibilité du modèle cellulaire vis-à-vis de l'information obtenue par la méthode *in vivo*. On parle alors d'**étude de corrélation**.

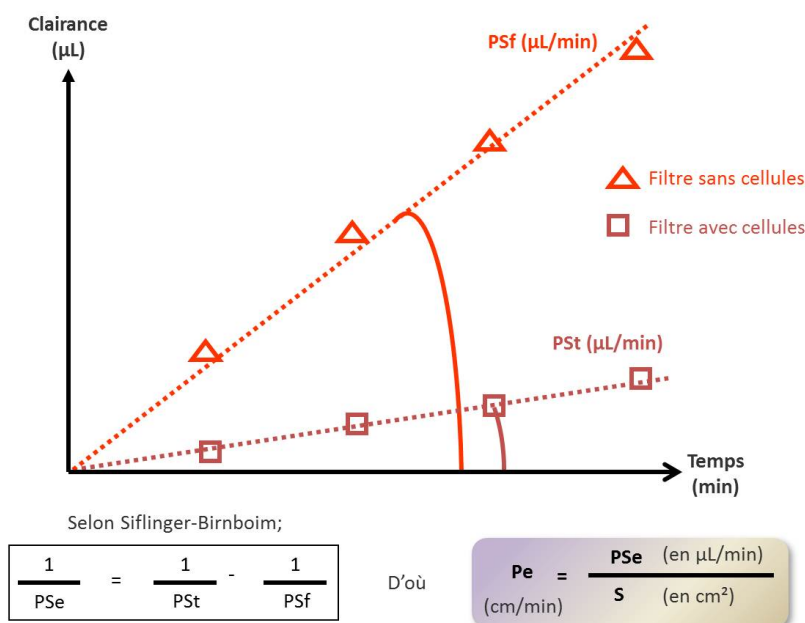


Figure 23 – **Calcul de la perméabilité de la BHE : détermination du P_e , d'après Cecchelli *et al.* (1999).** Le P_e est déterminé à partir de la relation décrite par Siflinger-Birnboim *et al.* (1987). Elle est basée sur le principe du calcul de la clairance. C'est la formule $V_R = C_D \times V_D / C_R$, où R représente le compartiment receveur et D le compartiment donneur, qui permet de calculer le volume de clairance. Les volumes de clairance calculés sont reportés sur un graphe en fonction du temps et permettent d'obtenir, par régression linéaire, une valeur de perméabilité en présence ou en absence de cellules : respectivement P_{St} pour le produit Permeabilité x Surface total (pour le filtre et les cellules) et P_{Sf} pour le produit Permeabilité x Surface pour le filtre seul. La valeur de P_{Se} (produit Permeabilité x Surface de l'endothélium) est calculée selon la formule : $1/P_{Se} = 1/P_{St} - 1/P_{Sf}$, et correspond au produit de la perméabilité endothéliale par la surface de la membrane. Pour obtenir le P_e (coefficient de perméabilité endothéliale) en cm/min, la valeur de P_{Se} doit donc être divisée par la surface du filtre (S). Certains auteurs ne corrigent pas le produit Permeabilité x Surface total avec le produit Permeabilité x Surface du filtre, on ne parle alors plus de P_e mais de P_{app} (perméabilité apparente).

2.2.2.4 Les modèles de base : soloculture de cellules endothéliales

Le premier modèle *in vitro* de BHE basé sur un système de culture sur filtre fut celui que nous venons de décrire (Bowman *et al.*, 1983) : il comprenait des cellules endothéliales cérébrales d'origine bovine, cultivées seules à la surface du filtre. Ainsi, les premières études utilisaient des solocultures (Abbott *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1983; Rutten *et al.*, 1987), mais dans ces conditions les cellules endothéliales cérébrales perdent certaines de leurs caractéristiques comme l'activité γ -GT, qui peut être réinduite en présence de cellules gliales (DeBault et Cancilla, 1980).

Il existe cependant des modèles ainsi faits, et qui présentent une TEER élevée : il s'agit par exemple du modèle développé par [Franke et al. \(2000\)](#) basé sur une soloculture de cellules endothéliales cérébrales porcines cultivées en absence de sérum et de facteurs astrocytaires, mais en présence d'hydrocortisone. Ce modèle présente une TEER élevée ainsi qu'une faible perméabilité au saccharose. Ce glucocorticoïde a été utilisé et a induit ces mêmes propriétés dans différents modèles cellulaires de BHE murins ([Omid et al., 2003](#); [Perrière et al., 2005](#); [Weidenfeller et al., 2005](#)).

Bien que les cellules endothéliales soient le siège de la BHE, d'autres types cellulaires jouent un rôle inducteur et/ou modulateur des propriétés structurelles et fonctionnelles de la BHE, ce qui a mené à inclure d'autres types cellulaires (cellules gliales/astrocytes, péricytes et neurones) ou à utiliser leur milieu conditionné pour mimer leur influence dans différents modèles de BHE.

2.2.2.5 Les modèles de coculture

Les cocultures cellules endothéliales-cellules gliales. Compte tenu de l'implication bien établie des astrocytes dans la différenciation de la BHE ([Abbott et al., 2006](#); [Delorme et al., 1968](#); [Janzer et Raff, 1987](#)), ce sont eux qui ont donné lieu au plus grand nombre de modèles de coculture de BHE (pour revue, voir [Deli et al., 2005](#)). Ils allient les différents types de cultures de cellules endothéliales précédemment décrits et des cellules gliales au sein de systèmes de culture sur filtre.

Les cellules gliales mises en coculture peuvent être des cultures primaires ([Li et al., 2010](#); [Shayan et al., 2010](#)) ou des lignées, dont la lignée C6 (cellules de gliome de rat) est une des plus utilisées ([Deli et al., 2003](#); [Lauer et al., 2004](#)). Certaines études démontrent une augmentation de la TEER et une diminution significatives de la perméabilité paracellulaire au niveau des cellules endothéliales en leur présence ([Raub, 1996](#); [Zenker et al., 2003](#)). Cependant, l'effet inducteur des cellules C6 n'est pas aussi important que celui des cellules gliales primaires, avec au niveau des cellules endothéliales une TEER moins élevée et une perméabilité paracellulaire plus importante, une morphologie altérée et une expression réduite de la P-gp par rapport à la coculture impliquant des cellules gliales primaires ([Boveri et al., 2005](#)). Dans ce modèle il a été démontré que les cellules C6 sécrétaient une quantité importante de *vascular endothelial growth factor* (VEGF) par rapport aux cellules gliales primaires, pouvant expliquer les effets observés. En revanche, l'effet inducteur des cellules gliales primaires sur les cellules endothéliales est largement décrit et accepté car démontré dans de très nombreux modèles ([Abbott et al., 2006](#); [Cecchelli et al., 2007](#); [Deli et al., 2005](#)).

Certains modèles sont dits « syngéniques », c'est-à-dire que les cellules endothéliales et les cel-

lules gliales sont issues de la même espèce ; c'est le cas des modèles de souris développés par *Stamatovic et al.* (2005) et *Coisne et al.* (2005), ou de rat développés par *Veszelka et al.* (2007) et *Hutamekalin et al.* (2008). Le modèle décrit par *Shayan et al.* (2010) comprend cellules endothéliales de souris et astrocytes de rat. D'autres modèles intègrent des cultures d'origine différentes, comme c'est le cas du modèle bovin de *Dehouck et al.* (1990) qui a été largement caractérisé (Figure 24), réunissant cellules endothéliales cérébrales bovines et cellules gliales de rats nouveaux-nés.

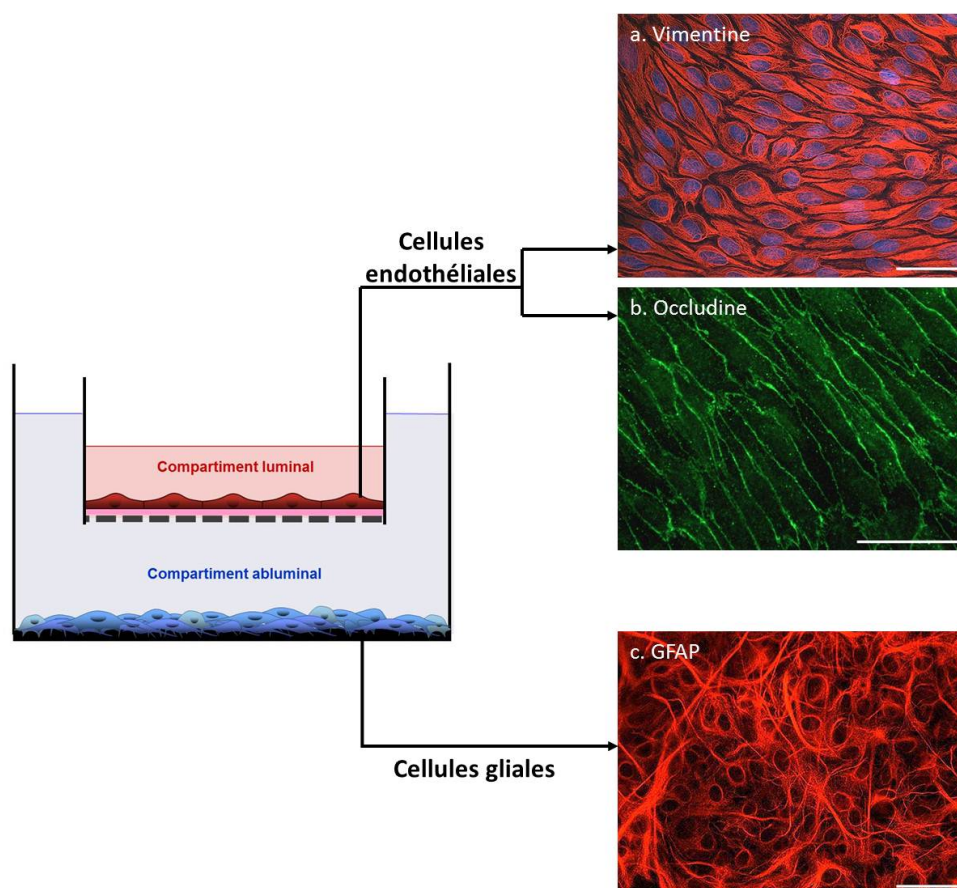


Figure 24 – **Modèle *in vitro* de BHE basé sur la coculture réunissant cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins et cellules gliales de rats, d'après Dehouck et al. (2011).** Les cellules endothéliales, ici immunomarquées pour la vimentine (a., en rouge, et les noyaux marqués au colorant de Hoechst, en bleu) et l'occludine (b., en vert), sont cultivées à la surface d'un filtre recouvert de gel de collagène de queue de rat. Les cellules gliales sont quant à elles cultivées dans le fond du puits : elles sont majoritairement constituées d'astrocytes (en c., ici marqués pour la GFAP, en rouge) mais comprennent aussi des oligodendrocytes et des cellules microgliales. Barres = 50 μm.

Dehouck et al. (1990), en cocultivant ces cellules de part et d'autre d'un filtre, ont observé une augmentation de la résistance électrique de la monocouche des cellules endothéliales, accompagnée d'une diminution de la perméabilité au saccharose et à l'inuline. Le même effet est observé lorsque la coculture est réalisée avec les cellules glialesensemencées dans le fond du puits et les cellules en-

dothéliales sur le filtre, donc à distance (Dehouck *et al.*, 1994). Dans ce cas, les deux types cellulaires sont encore plus distants, impliquant l'intervention de facteurs solubles dans ces phénomènes.

Certains modèles cocultivent des lignées endothéliales et des cultures primaires de cellules gliales (Lauer *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010; Sobue *et al.*, 1999).

Certains auteurs ont aussi utilisé du **milieu conditionné** de cellules gliales pour mimer leur influence ; en effet, l'expression des jonctions serrées peut être réinduite au niveau des cellules endothéliales cultivées en présence de milieu conditionné d'astrocytes (Rubin *et al.*, 1991; Siddharthan *et al.*, 2007; Wolburg *et al.*, 1994). Toutefois, Rubin *et al.* (1991) ont montré que le milieu conditionné est nécessaire mais pas suffisant et que l'ajout d'adénosine mono-phosphate cyclique (AMP_c) est indispensable à cette réinduction. Ce composé et ses analogues ont donc été utilisés, au même titre que l'hydrocortisone, pour induire ou renforcer les propriétés restrictives de la BHE dans des modèles cellulaires *in vitro* (Wegener *et al.*, 2000).

Étant donné la proximité des cellules endothéliales et des péricytes *in vivo* et le rôle émergeant des péricytes dans la formation des vaisseaux sanguins et de la BHE, des cocultures mettant ces deux types cellulaires en relation ont été mises au point.

Les cocultures cellules endothéliales-péricytes. Plusieurs types de cocultures cellules endothéliales-péricytes ont été mis en place, permettant notamment d'étudier l'influence des péricytes sur la perméabilité de la BHE.

Comme cela a pu être démontré dans des modèles murins, les péricytes sont capables d'induire une augmentation de la TEER au niveau des cellules endothéliales en coculture (Hayashi *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2009), ainsi qu'une diminution de la perméabilité paracellulaire de cellules endothéliales (Dohgu *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2004). En 2004, Hori *et al.* (2004) démontraient que le milieu conditionné d'une lignée de péricytes induisait l'expression d'occludine au niveau d'une lignée endothéliale. Ces données indiquent donc que les péricytes pourraient renforcer les propriétés de la BHE en influençant leur perméabilité et l'expression de protéines des jonctions serrées.

Les péricytes ont en revanche entraîné une augmentation de perméabilité au niveau de cellules endothéliales bovines d'après les résultats obtenus par Ruchoux *et al.* (2002), et une diminution la TEER de la monocouche endothéliale selon Thanabalasundaram *et al.* (2011a, 2010), respectivement dans des modèles bovin et porcin.

À la lumière de ces expériences il est pour l'instant difficile de conclure définitivement sur l'influence des péricytes cérébraux sur le phénotype de BHE.

Autres types de cocultures. Enfin, d'autres cocultures ont aussi mis en relation :

- des cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales bovines et des macrophages, permettant une diminution de la TEER, au même titre que les cellules C6 ([Zenker et al., 2003](#)) ;
- des cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales de rat et des progéniteurs neuraux, permettant une augmentation de la TEER et une diminution de la perméabilité endothéliale à la fluorescéine ([Weidenfeller et al., 2007](#)) ;
- la lignée endothéliale RBE4 avec des neurones corticaux de rat, induisant l'expression de l'occludine et sa localisation à la périphérie des cellules endothéliales ([Cestelli et al., 2001](#)).

Certains modèles réunissent trois populations cellulaires (cellules endothéliales, astrocytes et neurones ou péricytes), compliquant leur mise en place mais permettant de se rapprocher encore des conditions régnant au niveau de la BHE *in vivo*.

2.2.2.6 Les modèles de triculture

Quelques tricultures combinant cellules endothéliales cérébrales, astrocytes et neurones ont été établies. Dans le modèle décrit par [Schiera et al. \(2005\)](#), la présence à la fois des astrocytes et des neurones permettait une réduction de la perméabilité paracellulaire de la lignée RBE4.

Parmi les tricultures existantes, celle de [Nakagawa et al. \(2007\)](#) réunit des cellules endothéliales cérébrales, des péricytes cérébraux et des astrocytes de rat selon les différentes configurations possibles (Figure 25).

Tous les modèles ainsi formés ont été caractérisés en terme de TEER et de perméabilité de la monocouche à la fluorescéine : la combinaison présentant la plus haute TEER correspond à la triculture où les péricytes sont cultivés sous le filtre et les cellules gliales en fond de puits, suggérant l'effet inducteur synergique de ces deux populations sur la TEER endothéliale. La présence des péricytes ou des astrocytes en co- ou triculture entraîne une diminution significative de la perméabilité à la fluorescéine par rapport à la soloculture endothéliale. Il faut noter que les péricytes induisaient une augmentation de la TEER endothéliale en coculture d'amplitude plus importante que celle induite par les astrocytes dans les mêmes conditions. La triculture, dont la TEER était la plus forte,

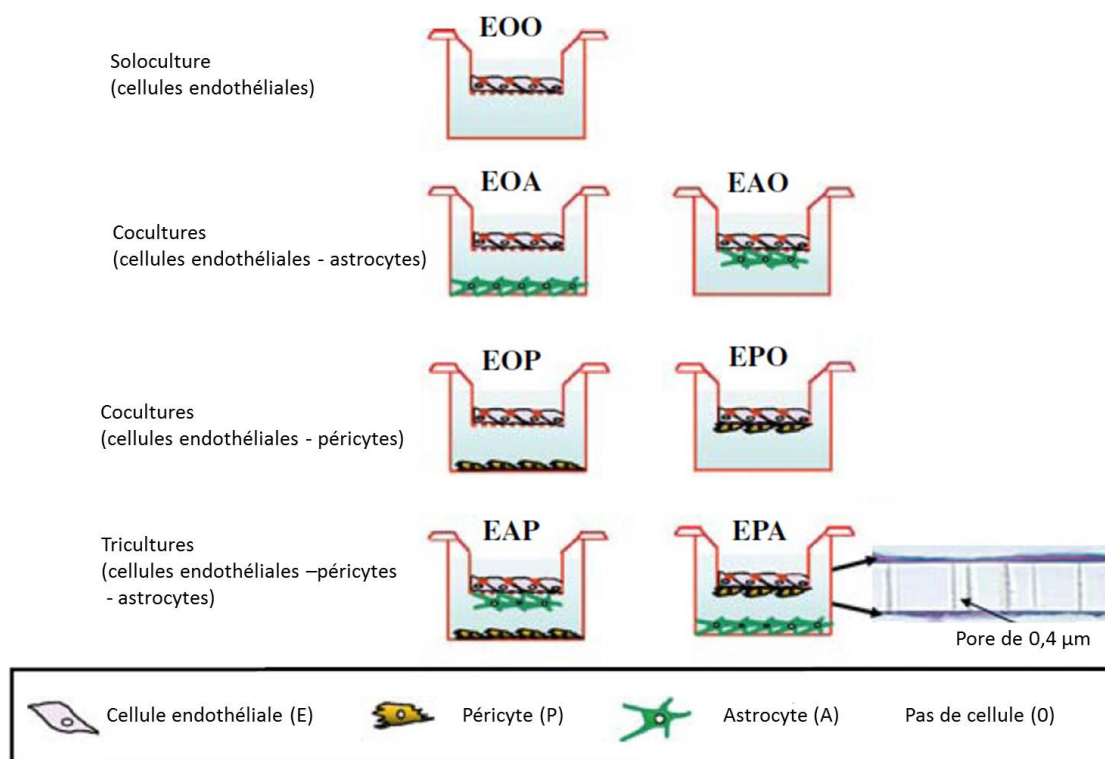


Figure 25 – Schémas représentant les différentes configurations de culture testées par Nakagawa *et al.* (2007).

fut caractérisée en terme d'expression de marqueurs endothéliaux (*von Willebrand factor* (vWF)), péricytaires (*neuron-glial2* (NG2)) et astrocytaires (GFAP). L'ultrastructure de la monocouche endothéliale, l'expression des protéines des jonctions serrées (ZO-1, occludine et claudine-5) et des transporteurs (GLUT-1, P-gp et MRP1) ont également étudiées (Nakagawa *et al.*, 2009).

Al Ahmad *et al.* (2009) ont aussi mis au point une triculture réunissant cellules endothéliales, péricytes et astrocytes de part et d'autre d'un filtre, où les péricytes et les astrocytes forment une culture mixte à la face inférieure du filtre. Dans ce modèle les péricytes renforcent aussi les propriétés restrictives de la BHE, en augmentant la TEER et réduisant la perméabilité paracellulaire endothéliale.

Récemment, Hatherell *et al.* (2011) ont développé une triculture comprenant la lignée endothéliale humaine hCMEC/D3, des péricytes cérébraux et des astrocytes humains selon différentes configurations. Même si les péricytes en coculture avec les cellules endothéliales induisaient une augmentation significative de la TEER par rapport à la soloculture, cette augmentation était moins importante que celle induite par les astrocytes, contrairement à ce qu'ont montré Nakagawa *et al.* (2009). De la même manière, l'ajout des péricytes pour former une triculture n'a pas induit d'augmentation supplémentaire de la TEER mais plutôt une diminution par rapport à la coculture cellules endothéliales-astrocytes (Hatherell *et al.*, 2011), à l'inverse des résultats obtenus par Nakagawa *et al.*

(2009), suggérant un effet négatif des péricytes sur la résistance des jonctions serrées dans cette condition.

Al Ahmad *et al.* (2011) ont également réuni ces trois types cellulaires dans un système constitué d'une matrice dans laquelle les cellules pouvaient former des structures tridimensionnelles de type capillaire (et donc cette fois pas de part et d'autre d'un filtre), permettant d'étudier les interactions cellulaires impliquées dans la mise en place des vaisseaux cérébraux en conditions physiologiques et hypoxiques. Un système similaire avait déjà été utilisé par Ramsauer *et al.* (2002) pour observer les phénomènes angiogéniques cérébraux *in vitro*.

La connaissance des péricytes cérébraux et de leurs effets au niveau des cellules formant la BHE reste limitée et les résultats contradictoires obtenus à leur sujet invitent à poursuivre ces expériences. Introduisant tous les types cellulaires présents dans le parenchyme cérébral, certaines équipes ont développé des modèles de BHE cocultivant des cellules endothéliales et des tranches organotypiques cérébrales.

2.2.2.7 Les modèles de BHE tridimensionnels : cocultures cellules endothéliales-tranches organotypiques cérébrales

Des modèles mettant en contact des cellules endothéliales avec des tranches organotypiques de cerveaux ont été mis au point (Duport *et al.*, 1998; Zehendner *et al.*, 2009). Le modèle de Duport *et al.* (1998) comprend une monocouche de cellules endothéliales murines, cultivée sur la face inférieure d'un filtre recouvert d'une tranche d'hippocampe (Figure 26) : après dix jours de coculture, l'étude de la monocouche a révélé la présence de jonctions serrées fonctionnelles, et les enregistrements électrophysiologiques une activité électrique des neurones semblable à celle mesurée *in situ*. Ce modèle permet, grâce à la présence d'électrodes, d'étudier l'effet de molécules sur l'activité électrique neuronale suite à leur passage à travers la BHE (Duport *et al.*, 1998). Le modèle développé par Zehendner *et al.* (2009), basé sur le même principe, comprend une monocouche de cellules endothéliales cérébrales murines sur laquelle est déposée une tranche de cortex. Ce modèle a notamment été caractérisé en terme d'expression des jonctions serrées et d'impédance, puis la réponse de la BHE ainsi formée a été étudiée en conditions ischémiques et a démontré que l'ouverture de la BHE consécutive à une *oxygen glucose deprivation* (OGD) - mimant les conditions ischémiques - était plus forte en condition de coculture avec les tranches organotypiques qu'en condition de soloculture endothéliale. Il a récemment permis d'étudier le mécanisme d'ouverture de la BHE en conditions ischémiques (Zehendner *et al.*, 2011).

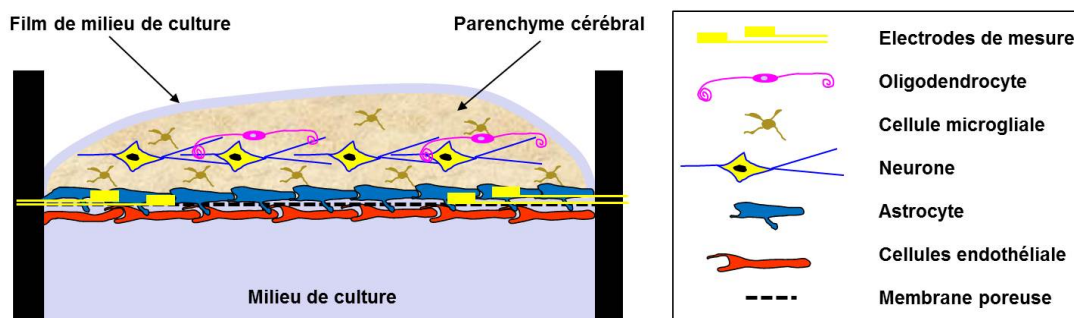


Figure 26 – Schémas représentant la coculture de cellules endothéliales cérébrales et de tranches organotypiques cérébrales. Adapté de *Duport et al.* (1998), avec l’amabilité du Pr Luc Stoppini.

D’autres éléments, cette fois-ci non cellulaires, influencent aussi le phénotype des cellules endothéliales : il s’agit notamment de la matrice extracellulaire et des forces de cisaillement créées par le flux sanguin à la surface des cellules endothéliales *in vivo*. La prise en compte de ce dernier paramètre a entraîné la mise en place d’un modèle dynamique très particulier.

2.2.2.8 Les modèles dynamiques pour la prise en compte des contraintes de cisaillement

Partant du constat que les contraintes de cisaillement étaient des stimuli physiologiques négligés dans la différenciation des cellules endothéliales, *Stanness et al.* (1996) ont développé un modèle où les cellules endothéliales,ensemencées à l’intérieur de fibres creuses, sont exposées à un flux intraluminal. L’appareillage autorise la coculture des cellules endothéliales avec des cellules gliales, cultivées quant à elles sur la surface externe des fibres (Figure 27).

Ce système permet l’induction des propriétés de la BHE au niveau des cellules endothéliales (notamment haute TEER, présence de jonctions serrées, faible perméabilité à la morphine, au saccharose et au mannitol) (*Stanness et al.*, 1997). L’application d’un flux luminal est capable d’augmenter l’expression de protéines des jonctions serrées et adhérentes, et l’expression de pompes d’efflux et d’enzymes ; de favoriser l’expression des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs tout en inhibant l’expression des enzymes impliquées dans la voie glycolytique ; mais aussi d’inhiber la prolifération des cellules endothéliales (*Cucullo et al.*, 2011). Ce paramètre d’ordre physique participe donc à la différenciation de ces dernières en affectant de nombreux aspects de la physiologie endothéliale.

Ce système, décrit comme reproduisant fidèlement les conditions régnant *in vivo*, permet donc d’étudier l’effet du flux sur les caractéristiques endothéliales ainsi que les voies de signalisation

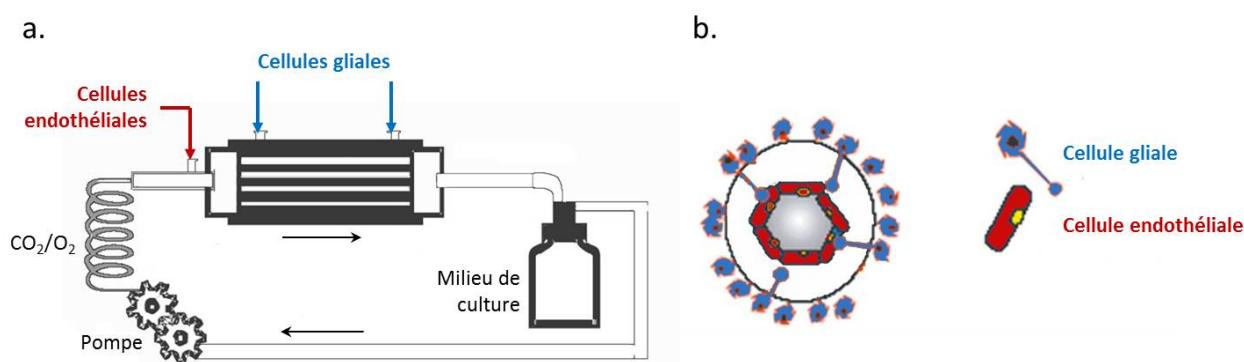


Figure 27 – Schémas représentant l'appareillage et la structure du modèle dit « dynamique » de BHE, car appliquant un flux pulsatile au niveau intraluminal. Modifié de Marroni *et al.* (2003).

a. Les cellules endothéliales et gliales sont respectivement ensemencées face luminale et abluminale des fibres creuses (capillaires artificiels en polypropylène), au sein d'un compartiment alimenté en milieu de culture. Le flux, assuré par une pompe, est unidirectionnel (flèches noires).

b. Les fibres creuses, dont la paroi est poreuse (pores de $0,5\ \mu\text{m}$ de diamètre), ne permettent pas la migration des cellules endothéliales. Les astrocytes peuvent quant à eux émettre leurs prolongements en direction de la face abluminale des cellules endothéliales.

impliquées dans cet effet (Colgan *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2011), mais sa mise en place est délicate (Marroni *et al.*, 2003).

2.2.3 Les modèles non cellulaires

Les membranes artificielles immobilisées (MAIs) sont utilisées pour l'analyse et la purification de molécules biologiques (protéines, acides nucléiques). La phase stationnaire d'une MAI consiste en une monocouche de phospholipides reliés de manière covalente à des particules de silice inertes. L'ensemble forme une surface chromatographique stable modélisant la face externe des membranes cellulaires, utilisée comme interface chromatographique en chromatographie liquide haute performance (HPLC). Elle peut être utilisée afin de séparer ou d'immobiliser de manière non-covalente des protéines membranaires. La chromatographie sur MAI s'est avérée utile pour estimer la perméabilité de petites molécules à travers les membranes biologiques (Pidgeon *et al.*, 1995), et a donc été proposée pour la prédiction de la perméabilité de composés à travers la BHE (Reichel et Begley, 1998). Cependant, ce système ne présente pas les propriétés dynamiques des membranes biologiques telles que la diffusion latérale des lipides, et ne tient compte que d'une seule monocouche phospholipidique. En outre, l'utilisation de cette technique trouve sa limite lorsque la molécule voit son transport limité ou facilité par des protéines membranaires, et ne peut donc être prédictive de la perméabilité à travers la BHE que si son transport dépend uniquement d'une diffusion passive (Malakoutikhah *et al.*, 2008).

Les *parallel artificial membrane permeability assays* (PAMPAs) ont d'abord été développés afin de prédire l'absorption gastro-intestinale de molécules. Ils sont généralement basés sur des plaques 96 puits divisées en 2 parties : la partie inférieure comprend les puits contenant la molécule à tester (compartiments donneurs), séparée de la partie supérieure (compartiments receveurs) par une série de membranes lipidiques artificielles associées à des supports filtrés (Figure 28). La membrane lipidique est préparée en dispersant des phospholipides à l'aide d'un solvant organique à la surface du filtre. La solution contenant la molécule à tester pourra diffuser vers le compartiment supérieur à travers l'interface lipidique créée.

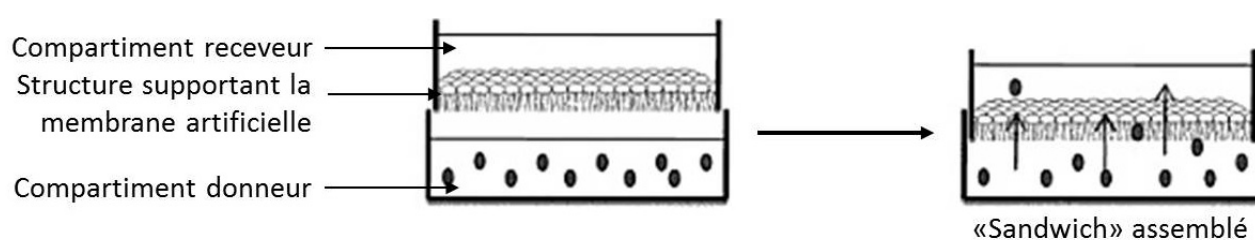


Figure 28 – **Principe du système PAMPA.** Modifié de [Mason \(2009\)](#).

En modifiant la composition lipidique des membranes artificielles, le système PAMPA a donné lieu à des investigations variées. Ainsi, en modifiant la composition de la membrane à l'aide d'un extrait lipidique de cerveau de porc, [Di et al. \(2003\)](#) ont formé un « BBB-PAMPA » capable de prédire la perméabilité de composés à travers la BHE. Comme pour la technique précédente, si des transporteurs sont impliqués dans le transport du composé, la prédiction est faussée : ainsi, une molécule substrat de la P-gp peut être prédite comme passant facilement la BHE selon les résultats du PAMPA, alors qu'en réalité elle sera effluée de manière importante, donnant lieu à un faux positif ([Mensch et al., 2010](#)).

2.3 Les modèles *in silico*

Différents modèles *in silico* ont été développés afin de prédire la perméabilité de la BHE à divers composés, se basant principalement sur la relation existant entre la pénétration cérébrale d'une molécule et ses caractéristiques physico-chimiques ou structurales.

Ces caractéristiques incluent notamment la lipophilie, la masse moléculaire, la charge, la polarité et la structure bi- ou tridimensionnelle de la molécule en question. Ces paramètres sont obtenus à l'aide de diverses techniques. Par exemple la lipophilie, qui a été très précocement pris en compte

dans ces modèles, peut être estimée par le coefficient de partage octanol/eau du composé. En effet, il est communément admis que plus une molécule est lipophile, mieux elle diffuse à travers les membranes cellulaires, facilitant sa pénétration dans le compartiment cérébral. Une bonne corrélation entre le logarithme du coefficient de partage octanol/eau ($\log P$) et le logarithme du coefficient de perméabilité déterminé à l'aide de la technique de perfusion cérébrale *in situ* ($\log PS$), a été rapportée par **Smith et Takasato (1986)** ($R^2 = 0,96$; $n = 12$) ainsi que par **Gratton *et al.* (1997)** ($R^2 = 0,88$; $n = 18$). Cependant, si les molécules testées sont prises en charge par des transporteurs d'influx ou d'efflux, le coefficient de partage octanol/eau ne prédit pas sa pénétration cérébrale *in vivo*, étant respectivement sous- et surestimée sur la base de ce seul paramètre (Figure 29).

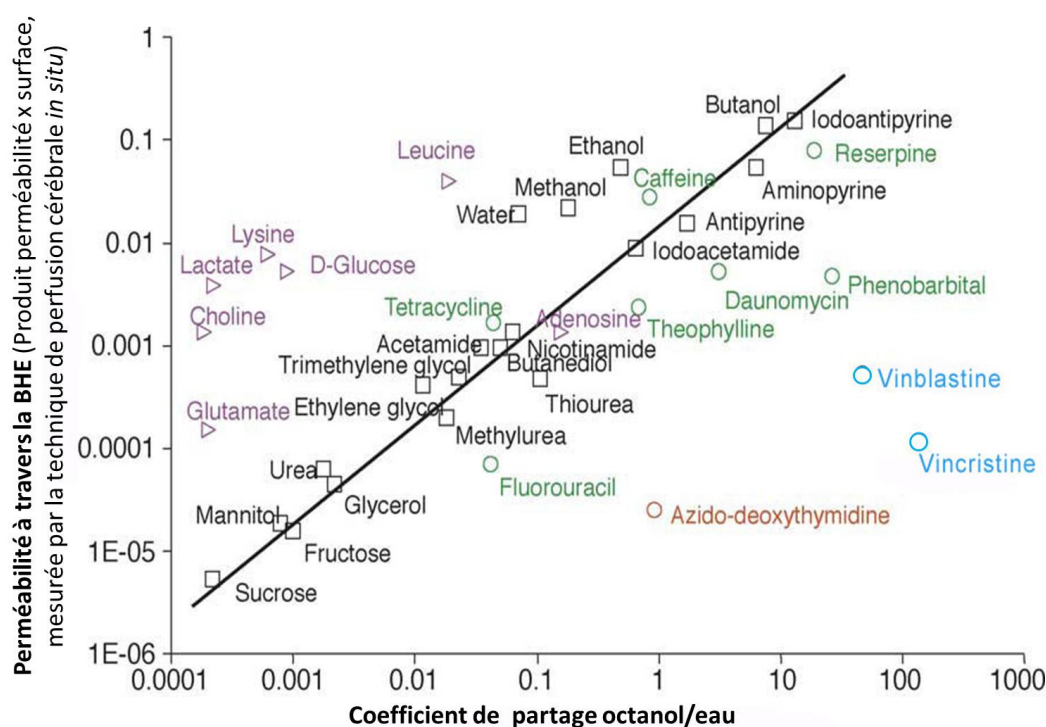


Figure 29 – **Relation entre la perméabilité de la BHE à différentes molécules et leur coefficient de partage octanol/eau, pour des traceurs de référence (□), des médicaments (○), et des nutriments (▷), d'après Smith (2003).**

Dans ce panel de molécules, les substrats de transporteurs d'influx sont écrits en **violet** : ils possèdent souvent une perméabilité supérieure à celle attendue selon leur faible lipophilie, car ils sont pris en charge par des transporteurs. En **bleu** sont représentés les substrats de la P-gp, un transporteur d'efflux majeur au niveau de la BHE : leur perméabilité est inférieure à celle attendue d'après leur coefficient de partage octanol/eau car ils sont efflués. En **rouge** est représenté un substrat d'un autre transporteur d'efflux (sensible au probénécide, qui inhibe les OATs), qui subit le même sort que les substrats de la P-gp : il est efficacement efflué. En **vert** sont représentées les molécules dont l'entrée dans le SNC se fait majoritairement par diffusion passive. Les valeurs de perméabilité ont été obtenues par la technique de perfusion cérébrale *in situ* chez le rat, en absence de protéines plasmatiques. Chaque point représente la moyenne de $n = 3$ à 8 mesures.

Les modèles *in silico* font généralement la relation entre les propriétés physico-chimiques de

la molécule et sa pénétration cérébrale estimée *in vivo*. La fiabilité des modèles développés repose donc sur la disponibilité de bases de données conséquentes et fiables, permettant de couvrir un large spectre de molécules aux caractéristiques variées (Ecker et Noe, 2006). La prise en compte de nombreux paramètres dans ces modèles nécessite la mise en place d'algorithmes puissants et efficaces, menant à l'établissement de modèles plus complexes mais plus prédictifs (Mehdipour et Hamidi, 2009). Alors qu'au départ ces modèles se concentraient exclusivement sur la pénétration cérébrale de petites molécules, ils se dirigent aujourd'hui vers la prédiction du passage de molécules plus grosses (Mehdipour et Hamidi, 2009).

Ces modèles présentent l'avantage de donner rapidement une estimation du potentiel de pénétration cérébrale du composé à moindre coût, c'est pourquoi les études *in silico* sont largement utilisées dans les étapes précoces de la découverte de médicaments dans l'industrie pharmaceutique, lors desquelles le criblage à haut débit de nombreuses molécules doit avoir lieu. Cependant, ils permettent uniquement de prédire la diffusion passive à travers la BHE, car les autres facteurs influençant le transport des molécules ne sont pas pris en compte. Par exemple, la connaissance de la relation entre la structure moléculaire et la prise en charge par un transporteur reste à ce jour limitée (Bickel, 2005). D'autres propriétés des composés, telles que leur affinité pour les protéines du plasma et pour le tissu cérébral, ou leur dégradation par des enzymes, ne sont pas considérées, ce qui peut également expliquer la faible pertinence des modèles *in silico* pour prédire la pénétration cérébrale de certains composés. Ces paramètres commencent pourtant à être étudiés (Summerfield *et al.*, 2007) et pris en compte dans ces modèles (Wan *et al.*, 2007). Par conséquent, les modèles *in silico* constituent un outil utile pour le criblage initial des composés, mais le recours à d'autres méthodes (*in vivo* ou *in vitro*) est nécessaire afin de confirmer les prédictions en émanant (Goodwin et Clark, 2005).

Les différents modèles de la BHE permettent donc d'étudier son fonctionnement et ses caractéristiques, mais chacun d'entre eux a ses propres avantages et inconvénients. Le choix du modèle utilisé dépendra donc du but poursuivi, selon l'application et le type de paramètre qui sera étudié. Même si les expériences menées *in vivo* demeurent indispensables à l'étude du fonctionnement de la BHE dans l'organisme, elles se heurtent à des difficultés éthiques et de mise en œuvre, voire d'interprétation en raison d'une trop grande complexité. Les modèles *in vitro*, qui constituent une approche plus aisée de la BHE, trouvent de nombreuses applications, concernant aussi bien la recherche fondamentale que la recherche appliquée, qui seront développées dans le chapitre suivant.

Utilisation des modèles *in vitro* de BHE : de la recherche fondamentale à la recherche appliquée

Sommaire

3.1 Compréhension des interactions cellulaires et moléculaires mises en jeu au sein de la BHE	80
3.1.1 Interactions cellules endothéliales - astrocytes	80
3.1.2 Interactions cellules endothéliales - péricytes	84
3.2 Optimisation du passage de molécules à travers la BHE	94
3.2.1 Approches chimiques	95
3.2.2 Approches biologiques	96
3.3 Études du transport de molécules à visée thérapeutique à travers la BHE lors des étapes précoces du processus de découverte des médicaments	101
3.4 Évaluation de la toxicité	102
3.4.1 Détection de la neurotoxicité	102
3.4.2 Modèles <i>in vitro</i> de BHE et détermination de la neurotoxicité	104
3.5 La BHE en tant que cible thérapeutique : implication dans l'étape de validation des cibles pharmacologiques	105

IL EXISTE de nombreux modèles *in vitro* de BHE, qui diffèrent en terme de composition cellulaire (soloculture, cocultures, etc.), d'espèce... Les modèles incluant différents types cellulaires permettent l'étude des interactions cellulaires et des mécanismes de transport mis en jeu au sein de la BHE. Cependant, ces modèles ne peuvent pas aisément être utilisés en recherche appliquée dans le cadre du criblage de molécules à haut débit - par exemple lors des étapes précoces de la découverte de médicaments - car ils sont difficiles à mettre en œuvre. En particulier l'industrie pharmaceutique a besoin de savoir précocement au cours des étapes de la découverte et du développement de médicaments à visée cérébrale s'ils traversent facilement ou non la BHE, mais le grand nombre de composés concernés nécessite la simplification et l'adaptation de ces modèles au criblage à moyen ou haut débit. Selon les caractéristiques nécessaires à l'investigation poursuivie, les acteurs de la recherche fondamentale et appliquée utiliseront donc différents modèles *in vitro* de BHE, dont les applications sont exposées dans les sections suivantes.

3.1 Compréhension des interactions cellulaires et moléculaires mises en jeu au sein de la BHE

Rapidement après avoir identifié les cellules endothéliales des capillaires cérébraux comme le siège de la BHE (Reese et Karnovsky, 1967), les chercheurs ont essayé de comprendre comment et pourquoi ces cellules endothéliales avaient des propriétés différentes de celles présentées par les cellules endothéliales périphériques.

3.1.1 Interactions cellules endothéliales - astrocytes

Depuis les observations et études menées *in vivo* suggérant et/ou démontrant l'origine astrocytaire de l'induction des propriétés de BHE au niveau de l'endothélium des capillaires cérébraux, de nombreuses investigations *in vitro* ont permis de confirmer ce pouvoir inducteur et même d'en découvrir certaines bases moléculaires. En effet la complexité de l'environnement *in vivo* rend difficile - voire impossible - l'étude de tels mécanismes.

Comme invoquées précédemment, deux stratégies ont été suivies afin de comprendre les mécanismes responsables de l'induction des propriétés de la BHE par les astrocytes : l'utilisation de milieu conditionné d'astrocytes (ou de cellules gliales), et de cocultures réunissant cellules endothéliales et astrocytes (ou cellules gliales).

3.1.1.1 Influence du milieu conditionné d'astrocytes

Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux cultivées seules se différencient et perdent rapidement leurs caractéristiques. Lorsqu'elles sont cultivées en présence de milieu conditionné d'astrocytes et d'AMP_c, l'expression des protéines des jonctions serrées peut être réinduite au niveau des cellules endothéliales (Rubin *et al.*, 1991; Wolburg *et al.*, 1994). L'augmentation de la TEER observée s'accompagne d'une diminution de la perméabilité au saccharose et d'une réorganisation de la F-actine corticale. De la même manière, Siddharthan *et al.* (2007) ont démontré que le milieu conditionné d'astrocytes peut induire une augmentation de la TEER et une diminution de la perméabilité paracellulaire corrélées à une augmentation de l'expression de ZO-1 au niveau de cellules endothéliales cérébrales en culture.

Le milieu conditionné possède aussi la capacité de réinduire certaines caractéristiques métaboliques de l'endothélium cérébral : par exemple, l'expression de la phosphatase alcaline est réinduite au niveau de cellules endothéliales d'artère pulmonaire en présence de milieu conditionné de cellules gliales humaines (Takemoto *et al.*, 1994). En revanche les résultats concernant l'activité γ -GT, qui disparaît lorsque les cellules endothéliales sont mises en culture seules (DeBault, 1981; Diglio *et al.*, 1982; Goetz *et al.*, 1985), sont contradictoires. Contrairement à Maxwell *et al.* (1987), DeBault et Cancilla (1980) ont montré que le milieu conditionné de cellules C6 ne permet pas la réinduction de l'activité γ -GT au niveau des cellules endothéliales. Il faut noter qu'une grande partie de l'activité γ -GT des capillaires cérébraux se concentre surtout dans les péricytes, les cellules endothéliales présentant une plus faible activité γ -GT (Risau *et al.*, 1992).

Ces résultats suggèrent donc que les astrocytes sécrètent un ou des facteurs solubles nécessaires à l'établissement de certaines propriétés de la BHE. Mais, puisque le milieu conditionné est parfois insuffisant, une seconde voie de recherche dans ce domaine consiste donc à réaliser des cocultures de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes, recréant les conditions régnant *in vivo*.

3.1.1.2 Influence des astrocytes sur les cellules endothéliales en coculture

Tao-Cheng et Brightman (1988) ont montré qu'une coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes réinduit la formation des jonctions serrées dont l'étendue et la complexité ressemblent à celles décrites *in vivo*. Une augmentation de la TEER et une diminution de la perméabilité paracellulaire endothéliale est observée dans de nombreuses cocultures unissant cellules endothéliales et astrocytes,

qu'ils soient cultivés de part et d'autre d'un filtre ou à distance (Dehouck *et al.*, 1994, 1990; Garcia *et al.*, 2004), suggérant que les effets observés impliquent l'intervention de facteurs solubles. Des résultats similaires ont été obtenus par Raub *et al.* (1992) au sein de cocultures de cellules C6 et de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux.

Les astrocytes sont capables de (ré)induire également certaines propriétés métaboliques (caractéristiques ou non) des cellules endothéliales de capillaires cérébraux telles que l'activité de la phosphatase alcaline (Beck *et al.*, 1986) et de la γ -GT au niveau de cellules endothéliales, comme démontré lorsqu'elles sont cultivées en présence de cellules C6 (DeBault, 1981; Raub *et al.*, 1992), de cultures primaires d'astrocytes (Dehouck *et al.*, 1990; Garcia *et al.*, 2004) ou de milieu conditionné de coculture (Garcia *et al.*, 2004).

Les résultats concernant l'activité de la P-gp sont quant à eux contradictoires. En effet, Lechardeur et Scherman (1995) montrent que le niveau d'expression de la P-gp dans les cellules endothéliales en culture primaire est identique à celui des capillaires isolés, suggérant que les cellules gliales n'ont aucun effet sur le taux d'expression de cette protéine. À l'inverse, les résultats de Joly *et al.* (1996) et de Gaillard *et al.* (2000) indiquent que la présence des astrocytes induit une augmentation de l'activité de la P-gp au niveau des cellules endothéliales en coculture. De même, Berezowski *et al.* (2004) et Fenart *et al.* (1998) ont respectivement démontré que l'expression transcriptionnelle et protéique de la P-gp dans les cellules endothéliales est plus importante lorsqu'elles sont cultivées en présence de cellules gliales.

L'expression du récepteur à la transferrine et la transcytose des LDLs est augmentée en présence de cellules gliales (Dehouck *et al.*, 1994). L'expression transcriptionnelle d'autres transporteurs et récepteurs est influencée par la présence des cellules gliales : l'expression des transporteurs ABCA2, A7 et ABCG1, récemment impliqués dans l'efflux de cholestérol, est régulée positivement en leur présence, alors que celle d'ABCA1 et de *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP)1 est réduite dans les mêmes conditions (Gosselet *et al.*, 2009). L'expression du *tissue plasminogen activator* (tPA) par les cellules endothéliales est réduite en présence d'astrocytes (Tran *et al.*, 1998). Toutes ces données indiquent une influence majeure des astrocytes sur le phénotype des cellules endothéliales, affectant divers aspects de leur physiologie.

Les cocultures donnent de meilleurs résultats que le milieu conditionné dans la réinduction des caractéristiques de l'endothélium cérébral, suggérant que la présence des cellules endothéliales influence la sécrétion par les astrocytes des facteurs responsables de cet effet. Ces données suggèrent

donc une communication bidirectionnelle entre ces deux populations cellulaires.

3.1.1.3 Signalisation intercellulaire

De nombreux efforts ont été faits pour identifier les agents responsables de l'induction et du maintien du phénotype de BHE dans lesquels les astrocytes sont impliqués. Leur nature est toujours débattue mais les modèles *in vitro* ont permis d'identifier plusieurs molécules-candidates (Abbott, 2002; Abbott *et al.*, 2006). Nous n'allons pas effectuer une revue exhaustive de la littérature sur le sujet, qui est abondante, mais notre propos sera illustré par quelques exemples.

Les expériences réalisées par Garcia *et al.* (2004), à l'aide d'une coculture unissant cellules endothéliales périphériques et astrocytes, montrent que ces derniers induisent une augmentation de la TEER et de l'activité γ -GT au niveau des cellules endothéliales. L'utilisation d'un anticorps neutralisant le *transforming growth factor- β* (TGF- β) réduit l'activité γ -GT au sein des cellules endothéliales cocultivées, indiquant qu'il représenterait un des facteurs inducteurs sécrétés par les astrocytes.

Le milieu conditionné d'astrocytes surexprimant le *src-suppressed C-kinase substrate* (SSECKS), un facteur qui stimule l'expression de l'angiopoïétine-1 (Ang-1) et réduit la production de VEGF par les astrocytes, entraîne une augmentation de l'expression des protéines des jonctions serrées et une diminution de la perméabilité au saccharose au niveau des cellules endothéliales (Lee *et al.*, 2003). Différentes molécules sécrétées par les astrocytes sont capables d'induire des propriétés de la BHE au niveau des cellules endothéliales en culture, telles que le TGF- β (Tran *et al.*, 1999), le *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF) (Igarashi *et al.*, 1999), le *basic fibroblast growth factor* (b-FGF) (Sobue *et al.*, 1999) et l'IL-6 (Sun *et al.*, 1997).

Alors qu'une pléthore d'études a été consacrée à la fonction des astrocytes au sein de la BHE, un autre type cellulaire a longtemps été négligé dans la littérature consacrée à ce sujet ; les péricytes. Les études menées récemment, *in vivo* et *in vitro*, commencent seulement à appréhender leur identité et leur rôle au niveau cérébral. Leur localisation au niveau de la paroi capillaire font des péricytes cérébraux des acteurs d'intérêt puisqu'ils se trouvent à l'interface entre la composante vasculaire et les composantes gliales et neuronales de l'UNGV.

3.1.2 Interactions cellules endothéliales - péricytes

Les péricytes ont été décrits pour la première fois par le physiologiste français Charles-Marie Benjamin Rouget il y a presque 140 ans (1873), d'où le nom initial de « cellules de Rouget ». Ce n'est qu'un peu plus tard que l'allemand Zimmermann (1923) leur donna le nom de « péricytes », qui traduit mieux leur localisation anatomique au niveau périendothélial (*péri* : autour, *cyto* : cellule).

Les souris mutées pour des gènes impliqués dans les fonctions vasculaires - codant pour des récepteurs (comme le PDGFR- β) ou des ligands (comme le PDGF-B) - se sont récemment avérées être des outils intéressants pour définir les mécanismes de régulation dans lesquels les péricytes interviennent. Cependant, la culture des péricytes et la mise au point de cocultures avec des cellules endothéliales ont fourni beaucoup d'informations sur leurs interactions avec ces dernières.

3.1.2.1 Caractéristiques des péricytes cérébraux

Morphologie et distribution. Au niveau des capillaires du SNC, les péricytes sont enchâssés dans la membrane basale qu'ils partagent avec les cellules endothéliales, et présentent un corps cellulaire ovoïde ou fusiforme comprenant un noyau proéminent et un espace cytoplasmique périnucléaire limité. De ce corps cellulaire émane un système élaboré de prolongements longitudinaux et circonférentiels encerclant l'endothélium sous-jacent (Figure 30a et b) : dans ces conditions, un seul péricyte contacte donc plusieurs cellules endothéliales (Allt et Lawrenson, 2001). De plus, la grande majorité des péricytes cérébraux présentent dans leur cytoplasme de nombreux lysosomes sous forme de granules cytoplasmiques, ce qui leur a valu l'appellation de « péricytes granulaires » (Farrell *et al.*, 1987). Ces données morphologiques et anatomiques permettent *in vivo* de les distinguer des cellules musculaires lisses (CMLs). Cependant, les péricytes sont connus pour présenter des différences à la fois morphologiques et fonctionnelles selon le tissu mais aussi au sein d'un même tissu, voire au sein d'un même lit capillaire (Dore-Duffy et Cleary, 2011; Sims, 1991). Comme cela a déjà été remarqué, la densité de péricytes est beaucoup plus élevée au niveau du SNC que dans le reste de l'organisme, suggérant un rôle important à ce niveau (Allt et Lawrenson, 2001).

In vitro les péricytes apparaissent comme de grandes cellules étoilées présentant de nombreux prolongements (Figure 30c) et des granules cytoplasmiques caractéristiques, mais leur morphologie peut varier selon la matrice utilisée (Kelley *et al.*, 1987). Contrairement aux cellules endothéliales, leur croissance n'est pas inhibée par le contact ; ils peuvent donc former des cultures multi-couches.

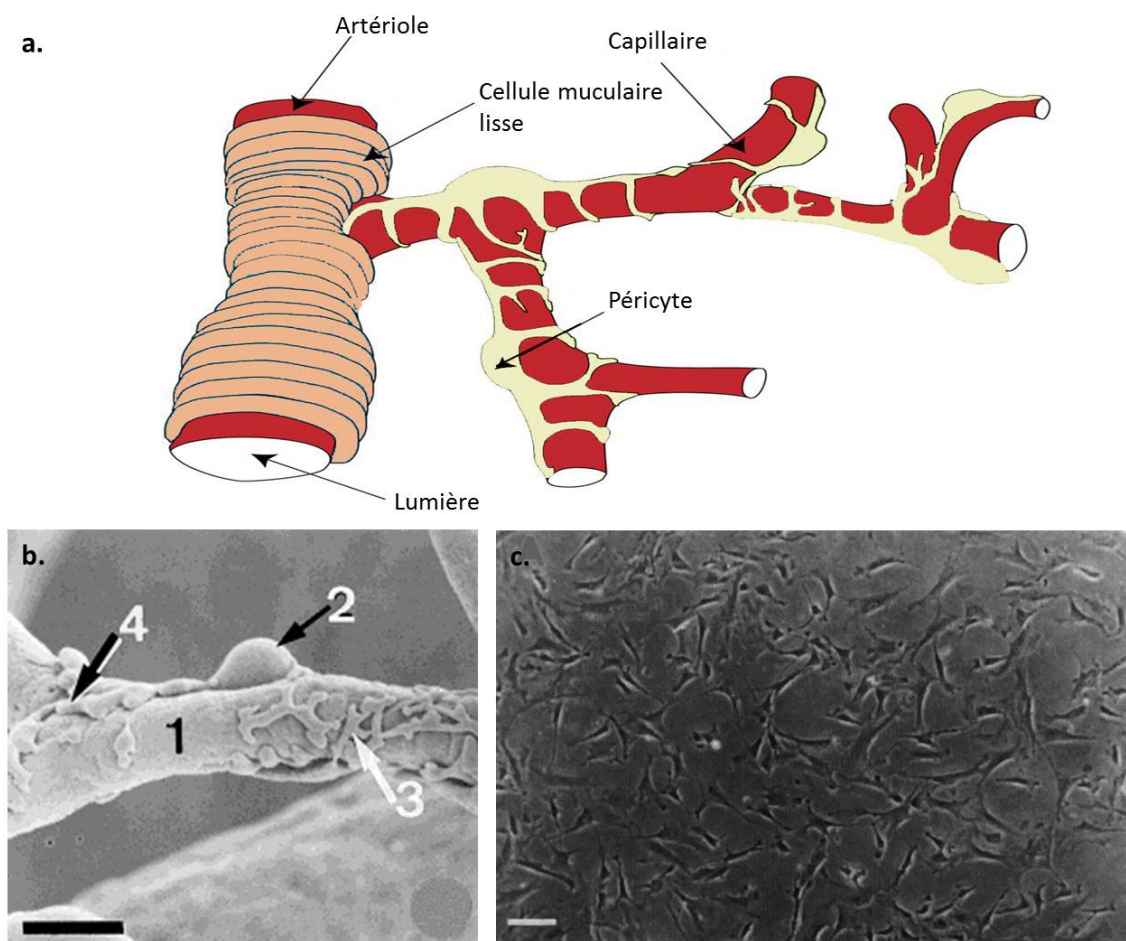


Figure 30 – Localisation et morphologie des péricytes cérébraux *in vivo* et *in vitro*.

a. Alors que les cellules musculaires lisses encerclent les artères et artérioles, les péricytes cérébraux émettent des prolongements le long et autour des capillaires auxquels ils sont associés, mais ne couvrent pas totalement la surface capillaire. Modifié de [Hamilton *et al.* \(2010\)](#).

b. Photographie en microscopie électronique à balayage d'un capillaire (1) du cortex cérébral humain. Le péricyte (2) émet des prolongements primaires et secondaires (3), distribués autour du tube capillaire et au niveau des zones de branchement (4). Barre = 11,5 μm , extrait de [Rodriguez-Baeza *et al.* \(1998\)](#).

c. Photographie en microscopie à contraste de phase de péricytes cérébraux bovins en culture. Barre = 100 μm , extrait de [Dehouck *et al.* \(1997\)](#).

Marqueurs des péricytes. A ce jour aucun marqueur phénotypique spécifique n'a été décrit pour les péricytes. Pour cette raison leur identification *in vivo* est tout d'abord basée sur leur localisation anatomique et leur morphologie, l'étude de diverses propriétés cellulaires et, *in vitro*, sur l'absence de contaminants cellulaires potentiels (tels que les cellules endothéliales et les CMLs).

Certains marqueurs de surface mis en évidence par immunohistochimie sont utilisés pour distinguer les péricytes d'autres types cellulaires, tels que le *high-molecular-weight melanoma-associated antigene* (HMW-MAA), aussi appelé NG2, et le Thy1.1 ou *cluster of differentiation* (CD)90. Alors que le premier correspond à un chondroïtine-sulfate protéoglycane exprimé à la surface des précur-

seurs des oligodendrocytes et des péricytes lors des processus angiogéniques ou vasculogéniques (Stallcup, 2002), le second est une glycoprotéine de la famille des immunoglobulines qui est aussi retrouvé chez les lymphocytes thymiques ainsi que chez les astrocytes (Risau *et al.*, 1990). Nayak *et al.* (1988) ont utilisé un anticorps monoclonal, nommé 3G5, dirigé contre un ganglioside exprimé à la surface des péricytes rétiens et cérébraux *in vivo* et *in vitro*. L'antigène correspondant est aussi exprimé par des neurones et des lymphocytes.

Des enzymes exprimées par les péricytes ont aussi été utilisées comme marqueurs pour ce type cellulaire, permettant leur détection histochemique. Parmi elles on trouve notamment la γ -GT, dont ils sont la source majoritaire au niveau des capillaires cérébraux (Risau *et al.*, 1992), mais également la phosphatase alcaline et l'aminopeptidase N (CD 13). Cette dernière a été identifiée chez les péricytes cérébraux, et de manière intéressante les péricytes des régions cérébrales dépourvues d'un endothélium-barrière (comme au niveau des organes circumventriculaires) n'expriment pas cette ectopeptidase (Kunz *et al.*, 1994). Exprimée à la face extracytoplasmique de la membrane plasmique des péricytes, cette enzyme serait donc un complément à la barrière métabolique de la BHE impliquée dans la dégradation des neuropeptides (Krause *et al.*, 1993).

De nombreux auteurs utilisent l' α -actine de muscle lisse pour caractériser et identifier les péricytes en culture, cependant cette protéine est aussi exprimée par les CMLs qui peuvent contaminer leur culture. Il apparaît que tous les péricytes cérébraux ne l'expriment pas *in vivo*, mais *in vitro* tous les péricytes deviennent potentiellement positifs pour cette protéine (Herman et D'Amore, 1985). Cette expression serait dynamique (Thanabalasundaram *et al.*, 2011b; Verbeek *et al.*, 1994) et serait régulée positivement en conditions pathologiques (Dore-Duffy *et al.*, 2011).

In vitro, il apparaît donc nécessaire d'utiliser une combinaison de marqueurs plutôt qu'un seul, couplée à une observation de leur morphologie et de leur caractéristiques de croissance pour exclure une contamination par des CMLs notamment.

Propriétés fonctionnelles des péricytes.

Contractilité et régulation du flux sanguin capillaire. Les péricytes présentent un appareil contractile fonctionnel, comme l'indiquent l'expression des protéines associées à cette fonction (Bandopadhyay *et al.*, 2001; Schönfelder *et al.*, 1998) et les preuves fonctionnelles obtenues *in vivo* (Fernandez-Klett *et al.*, 2010; Peppiatt *et al.*, 2006; Schönfelder *et al.*, 1998; Yemisci *et al.*, 2009) et *in vitro* (Kutcher *et al.*, 2007; Oishi *et al.*, 2007). Pour ces raisons les péricytes ont été très pré-

cocément assimilés à des CMLs. Cependant, il semblerait qu'*in vivo* seule une sous-population des péricytes cérébraux soient positifs pour l' α -actine de muscle lisse (Nehls et Drenckhahn, 1991), suggérant encore une fois une hétérogénéité fonctionnelle.

De plus, ils expriment une grande variété de récepteurs à différentes substances vasoactives, tels que les récepteurs à l'endothéline (Dore-Duffy *et al.*, 2011; McDonald *et al.*, 1995). Ainsi, les péricytes en culture sont capables de répondre à l'application d'endothéline-1 (Dehouck *et al.*, 1997) ou d'angiotensine II par une constriction (Matsugi *et al.*, 1997), mais se dilatent en réponse à la prostaglandine I₂ (PGI₂) (Dodge *et al.*, 1991). Des données obtenues *in vitro* et *in vivo* suggèrent que les péricytes cérébraux sont des effecteurs du couplage métabolique cérébral, régulant le flux sanguin capillaire en fonction des besoins métaboliques du tissu (Hamilton *et al.*, 2010). Les péricytes, qui intègrent des signaux provenant de l'UNGV et sont capables d'y répondre en modifiant le tonus microvasculaire, pourraient en cas de dysfonction jouer un rôle dans le développement de pathologies telles que la maladie d'Alzheimer et les AVCs (Bell *et al.*, 2010; Hamilton *et al.*, 2010; Kutcher et Herman, 2009; Yemisci *et al.*, 2009) ou dans les conséquences vasculaires des traumatismes crâniens (Dore-Duffy *et al.*, 2011).

Multipotentialité. Les péricytes cérébraux sont considérés comme des cellules multipotentielles au sein de la BHE adulte (Dore-Duffy, 2008). Ils peuvent en effet donner naissance à différents types cellulaires.

Ainsi, la capacité des péricytes à former des nodules calcifiés en culture a constitué la base des nombreuses études réalisées par le laboratoire d'Anne Canfield, démontrant que les péricytes constituent une source de cellules progénitrices ostéogéniques (Collett *et al.*, 2003). Ils peuvent aussi donner naissance à des adipocytes (Farrington-Rock *et al.*, 2004) et des CMLs (Nehls et Drenckhahn, 1993). En réponse au b-FGF *in vitro*, ils peuvent même exprimer des marqueurs gliaux et neuroaux (Dore-Duffy *et al.*, 2006). En tant que cellules multipotentielles, les péricytes pourraient donc constituer une source endogène de cellules souches dans le cadre de stratégies thérapeutiques.

Propriétés macrophagiques et immunologiques. De nombreuses études indiquent que les péricytes ont une fonction de macrophage dans le cerveau, fonction qui pourrait être unique à cet organe (Thomas, 1999). Ils peuvent ingérer des traceurs après injection systémique (Kristensson et Olsson, 1973), intraventriculaire (Mato *et al.*, 1980) ou directement dans le tissu (Pennell et Streit, 1998).

Ces résultats ont été confirmées par des études *in vitro* montrant l'ingestion de divers matériaux par ces cellules ; les péricytes en culture sont par exemple capables d'incorporer des billes de polystyrène (Balabanov *et al.*, 1996). En accord avec cette identité supposée, ils expriment des marqueurs macrophagiques tels que le CD4, le *Leucocyte Common Antigen*, le *complement receptor* (CR)3 et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II, et sont immunomarqués par l'anticorps monoclonal ED2 (Balabanov *et al.*, 1996; Thomas, 1999).

De plus, ils expriment constitutivement de faibles taux de *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) et *inter-cellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) (Thomas, 1999) et possèdent la capacité de présentation de l'antigène aux lymphocytes (Fabry *et al.*, 1993b). Ils produisent des cytokines immunorégulatrices telles que les interleukines IL-1 β et IL-6, et le *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GMCSF) (Balabanov et Dore-Duffy, 1998; Fabry *et al.*, 1993a).

Les péricytes cérébraux du SNC constitueraient donc une première ligne de défense immunitaire à l'interface entre le sang et le parenchyme cérébral (Balabanov et Dore-Duffy, 1998).

Propriétés pro- et anti-coagulantes. La position stratégique des péricytes au niveau de la paroi microvasculaire facilite leur intervention dans les événements de coagulation suite à une lésion ou une rupture microvasculaire. Bouchard *et al.* (1997) ont démontré la présence du facteur tissulaire - le premier générateur de la cascade de coagulation - à la surface des péricytes cérébraux humains en culture.

D'autre part, il a été démontré dans un modèle de coculture unissant cellules endothéliales et péricytes cérébraux humains que ces derniers inhibent l'expression de tPA par les cellules endothéliales, inhibition qui est renforcée lorsque les deux types cellulaires sont en contact (Kim *et al.*, 2006). De plus, ils expriment et sécrètent de manière importante la protéase nexine-1, un puissant inhibiteur des protéases à sérine dont fait partie le tPA et l'anti-thrombine (Kim *et al.*, 2006).

Les péricytes cérébraux possèderaient donc à la fois des propriétés pro- et anti-coagulantes, mais la régulation et l'implication de ces propriétés n'ont pour l'instant pas été étudiées *in vivo*.

3.1.2.2 Implication des péricytes dans la formation de la BHE et signalisation intercellulaire

Comme nous l'avons vu les péricytes cérébraux sont étroitement associés aux cellules endothéliales *in vivo*, dès les prémices de la vascularisation du SNC (Bauer *et al.*, 1993). De nombreuses études indiquent que ce type cellulaire joue un rôle majeur dans l'angiogenèse, la stabilisation des

vaisseaux et la mise en place de la BHE (Armulik *et al.*, 2010; Daneman *et al.*, 2010; Lindahl *et al.*, 1997; von Tell *et al.*, 2006). Beaucoup d'informations ont été apportées grâce aux animaux mutés pour des gènes impliqués dans la formation des vaisseaux, mais les données *in vitro* ont permis d'appréhender les interactions cellulaires et moléculaires impliquées lors de ces phénomènes (Lee *et al.*, 2009). Il a été démontré dans un modèle de coculture *in vitro* que les cellules endothéliales en prolifération sécrètent du PDGF-B (voir Figure 15) agissant comme un chémo-attractant et un mitogène sur des cellules progénitrices murales (précurseurs des péricytes et des CMLs), induisant une modification de la morphologie de ces dernières (Hirschi *et al.*, 1999, 1998).

Pour étudier l'**angiogenèse cérébrale** *in vitro*, Ramsauer *et al.* (2002) ont mis au point un modèle où cellules endothéliales, péricytes et astrocytes de rat sont réunis, permettant la formation de structures de type capillaire. Les péricytes migrent plus rapidement que les astrocytes au niveau de ces structures, et seule la présence des péricytes garantit leur stabilité, empêchant leur régression. Ce modèle d'« angiogenèse *in vitro* » permet donc d'appréhender les interactions cellulaires mises en jeu lors de la formation de la vasculature cérébrale. De la même manière, Itoh *et al.* (2011) ont réuni ces trois types cellulaires d'origine humaine *in vitro*, pour reformer ces structures et confirmer l'effet stabilisateur des péricytes. À l'aide de ce modèle ils ont démontré que le PDGFR- β est nécessaire au recrutement des péricytes à proximité des capillaires en formation, mais pas le VEGF.

Les péricytes sont associés à la **maturation des capillaires**, en commençant par l'inhibition de leur formation. En effet les péricytes inhibent la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* (Orlidge et D'Amore, 1987). D'après Kondo *et al.* (2005), cet effet anti-prolifératif pourrait être dû à l'inhibition de la voie de signalisation protéine kinase C/mitogen-activated protein kinase au niveau des cellules endothéliales. L'inhibition de leur croissance et de leur migration serait dépendante de contacts directs entre les deux types cellulaires, et de l'activation du TGF- β (Pepper, 1997). Ils peuvent tous les deux sécréter ce facteur sous forme inactive, mais son activation nécessiterait la présence de contacts entre les deux types cellulaires selon des études menées *in vitro* (Antonelli-Orlidge *et al.*, 1989; Sato *et al.*, 1990). Le TGF- β ainsi activé inhiberait la prolifération et la migration endothéliales. Ce facteur inhibe aussi la prolifération des péricytes en culture (Yan et Sage, 1998), et est impliqué dans l'expression du phénotype contractile à leur niveau (Hirschi *et al.*, 1998; Thanabalasundaram *et al.*, 2011b; Verbeek *et al.*, 1994). Ces résultats sont confortés par l'observation des défauts vasculaires que présentent les souris déficientes en TGF- β . Ainsi, *via* le TGF- β , les péricytes

inhiberaient la croissance endothéliale, mais ce phénomène nécessite un contact entre les deux types cellulaires.

En effet *in vivo* les péricytes et les cellules endothéliales établissent ponctuellement des contacts directs à travers des interruptions de la membrane basale qu'ils partagent. Trois types de jonctions ont été décrits dans la littérature (Diaz-Flores *et al.*, 2009; Rucker *et al.*, 2000) :

- les contacts de type « *peg-and-socket* » (Figure 31a). Ils correspondent à des prolongements cytoplasmiques des péricytes et des cellules endothéliales formant des interdigitations réciproques qui traversent la membrane basale (Allsopp et Gamble, 1979; Carlson, 1989).
- les jonctions adhérentes, connectant le cytosquelette des péricytes et des cellules endothéliales. Elles fournissent un attachement mécanique important, permettant d'ancrer les péricytes aux cellules endothéliales, tout en supportant la transmission de forces mécaniques contractiles. Elles seraient localisées au sein même des contacts « *peg-and-socket* ».
- les jonctions lacunaires ou jonctions « *gap* » (Figure 31b), permettant le transfert de petites molécules et ions entre les cytoplasmes des deux types cellulaires (Cuevas *et al.*, 1984; Fujimoto, 1995; Larson *et al.*, 1987).

Toutes ces jonctions interviennent dans la communication intercellulaire mais le rôle exact de ces contacts en conditions physiologiques et pathologiques n'est à ce jour pas clairement établi (Wakui *et al.*, 2006). Des interdigitations entre cellules endothéliales et péricytes sont surtout observées au niveau des sites angiogéniques (Wakui, 1988), et l'espace intercellulaire correspondant renfermeraient des facteurs de croissance et molécules de signalisation - *epidermal growth factor* (EGF), TGF- β , plasminogène et Ang-1 - selon Wakui *et al.* (1997, 1990, 2006).

Une autre étude indique quant à elle que le milieu conditionné de péricytes suffit à inhiber la croissance des cellules endothéliales - suggérant que le contact n'est pas nécessaire pour induire cet effet (Martin *et al.*, 2000) - et est capable d'inhiber leur migration *in vitro* (McIlroy *et al.*, 2006). Dans cette étude le milieu conditionné de péricytes induit une augmentation importante de l'expression de *plasminogen activator inhibitor type-1* (PAI-1) par les cellules endothéliales, qui est capable d'inhiber la migration des cellules endothéliales.

Au-delà du contrôle de la maturation des capillaires, les péricytes cérébraux influencent l'**induction**

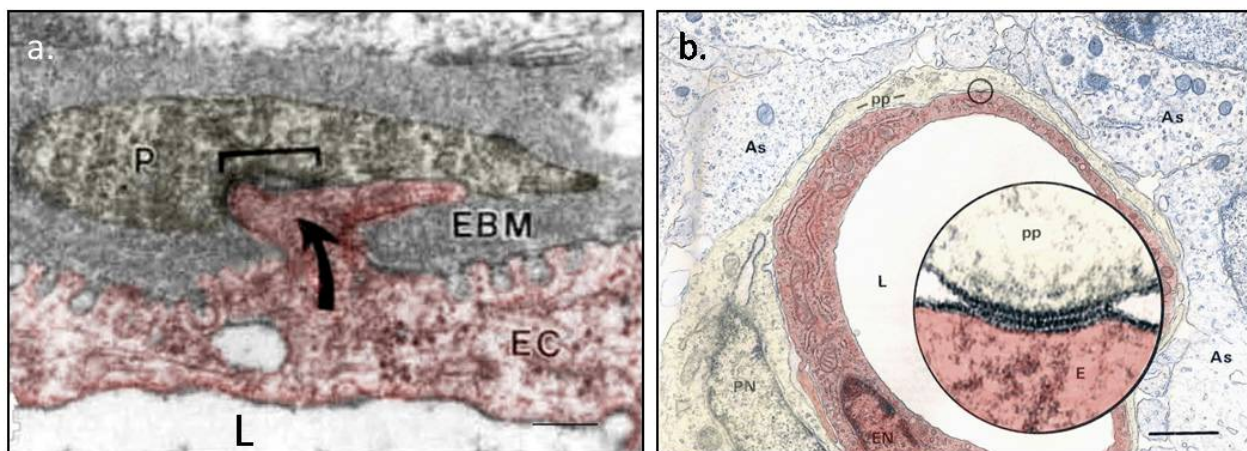


Figure 31 – **Contacts péricytes - cellules endothéliales observées en microscopie électronique *in vivo*.**

a. Photographie en microscopie électronique d'un capillaire rétinien humain, montrant un prolongement issu d'une cellule endothéliale (EC) traversant la membrane basale (EBM), formant une jonction « *peg-and-socket* » (flèche) avec le péricyte sous-jacent. P, péricyte ; EC, cellule endothéliale ; EBM, membrane basale subendothéliale et L, lumière du capillaire. Barre = 0,4 μm . Extrait de [Carlson \(1989\)](#).

b. Photographie en microscopie électronique d'une jonction lacunaire (encadrée sur la figure et grossie dans l'encart) entre un péricyte et une cellule endothéliale d'un capillaire cérébral de rat. PN, noyau du péricyte ; pp, prolongement du péricyte ; EN, noyau endothélial ; As, astrocyte et L, lumière du capillaire. Barre = 1 μm et $G_{\text{encart}} = \times 150,000$. Extrait de [Fujimoto \(1995\)](#).

de certaines propriétés de la BHE au niveau des cellules endothéliales d'après les récentes études menées *in vivo* ([Armulik et al., 2010](#); [Daneman et al., 2010](#)) et de nombreuses études *in vitro*.

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs modèles de coculture indiquent que les péricytes induisent une augmentation de la TEER et/ou une diminution de la perméabilité paracellulaire endothéliale ([Al Ahmad et al., 2009](#); [Dohgu et al., 2005](#); [Hayashi et al., 2004](#); [Nakagawa et al., 2009](#)). La matrice sécrétée par les péricytes est capable à elle seule d'améliorer la TEER ([Hartmann et al., 2007](#)). L'effet synergique des péricytes et des cellules gliales dans cette induction a pu être confirmé dans la triculture de [Nakagawa et al. \(2007\)](#). L'étude menée *in vitro* par [Hori et al. \(2004\)](#), utilisant des péricytes cérébraux immortalisés de rat adulte, démontre que l'Ang-1 induit l'expression d'occludine au niveau des cellules endothéliales avec lesquelles ils sont cocultivés. Un autre modèle de coculture démontre que les péricytes cérébraux peuvent induire et renforcer les propriétés de barrière ainsi que l'activité de la P-gp au niveau des cellules endothéliales cérébrales ([Dohgu et al., 2005](#); [Takata et al., 2007](#)). Ces effets ont été associés à la production de TGF- β par les péricytes. De plus, selon [Berezowski et al. \(2004\)](#), les péricytes pourraient induire l'expression de MRP 6 au niveau des cellules endothéliales cérébrales en culture *via* des facteurs solubles. Selon les résultats d'[Al Ahmad et al. \(2011\)](#), les péricytes en coculture avec les cellules endothéliales sont capables

d'induire la localisation luminale de la P-gp et de MRP 2 au niveau des cellules endothéliales, comme les astrocytes. D'après ces résultats les péricytes pourraient donc influencer différents aspects de la BHE au niveau des cellules endothéliales en modulant les jonctions intercellulaires ainsi que l'expression et l'activité de transporteurs.

Dans d'autres modèles, il a été démontré que la coculture entre péricytes et cellules endothéliales cérébrales induit une augmentation de la production endothéliale de *matrix metalloproteinase* (MMP)-9 (Zozulya *et al.*, 2008), capable d'induire une augmentation de la perméabilité de la BHE. Ce résultat a été confirmé récemment par Thanabalasundaram *et al.* (2010), montrant en outre une augmentation de la production de MMP 2 mais aussi de VEGF dans cette coculture où péricytes et cellules endothéliales sont en contact. De plus, la présence des péricytes induit une diminution de l'expression de l'occludine dans ce modèle. L'ensemble de ces données indiquent donc que les péricytes cérébraux pourraient réduire les propriétés restrictives de la BHE *via* la sécrétion de MMPs et de VEGF, ce qui pourrait jouer un rôle important en conditions pathologiques.

Réciproquement, les cellules endothéliales influencent aussi le phénotype des péricytes cérébraux : l'expression de l'aminopeptidase N est réinduite au niveau des péricytes en culture si et seulement s'ils établissent des contacts directs avec elles (Ramsauer *et al.*, 1998).

3.1.2.3 Les péricytes au sein de la BHE en conditions pathologiques

Une dysfonction ou une perte des péricytes cérébraux pourrait être impliquée dans le développement de diverses pathologies du SNC (Dalkara *et al.*, 2011; Dore-Duffy et Cleary, 2011; Quaegebeur *et al.*, 2010).

Les péricytes peuvent migrer de leur localisation péri-vasculaire suite à un stress, notamment ischémique (Duz *et al.*, 2007) et traumatique (Dore-Duffy *et al.*, 2000). En maintenant leur contraction malgré une reperfusion effective suite à l'occlusion d'une artère cérébrale, les péricytes empêchent la reperfusion efficace des capillaires au niveau des tissus ischémiés, et donc amplifieraient l'effet délétère de ce stress (Yemisici *et al.*, 2009).

L'influence des péricytes sur la réponse des cellules endothéliales en **conditions hypoxiques et/ou ischémiques** a été étudiée *in vitro*. Hayashi *et al.* (2004) démontrèrent que les péricytes cérébraux en coculture avec des cellules endothéliales réduisent significativement l'augmentation de perméabilité paracellulaire observée au niveau endothélial suite à l'hypoxie, mais seulement si les

deux types cellulaires sont cultivés à proximité. Selon les résultats obtenus par *Al Ahmad et al.* (2009), alors que les péricytes entraînent une exacerbation de l'ouverture de la BHE suite à un stress hypoxique (1% d'O₂) aigu en coculture, ils auraient en revanche un effet protecteur suite à un stress hypoxique plus long. Dans cette étude, c'est la configuration réunissant péricytes, cellules endothéliales et astrocytes qui permet le mieux de maintenir l'intégrité de la BHE en hypoxie prolongée. Dans le cas d'une quasi-anoxie (0.1% d'O₂) prolongée, les péricytes ont mieux protégé l'intégrité de la BHE que les astrocytes en coculture.

La même équipe a réuni ces trois types cellulaires dans un modèle tridimensionnel permettant la formation des structures de type capillaire, et y a étudié l'effet d'un stress hypoxique (*Al Ahmad et al.*, 2011). Dans ces conditions, la présence des astrocytes et des péricytes est nécessaire au maintien optimal de la morphologie des tubes formés et de la localisation correcte des protéines de jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales.

L'implication des péricytes cérébraux dans le développement de **maladies neurodégénératives** a aussi été suggéré (*Hamilton et al.*, 2010; *Quaeghebeur et al.*, 2010). Une étude récente démontre que la perte progressive des péricytes cérébraux chez les souris PDGFR- $\beta^{+/-}$ et PDGFR- $\beta^{F7/F7}$ entraîne au cours du temps une mauvaise perfusion cérébrale avec perturbation de la vasoréactivité et induit une ouverture de la BHE, menant notamment à l'accumulation périvasculaire de protéines plasmatiques (*Bell et al.*, 2010). L'âge des souris avançant, elles présentent des dommages neuronaux associés à des défauts d'apprentissage et de mémorisation spatiale, des phénomènes neurodégénératifs et neuroinflammatoires (*Bell et al.*, 2010). L'intégrité des péricytes est donc nécessaire au maintien de l'homéostasie cérébrale permettant un fonctionnement neuronal non altéré. Dans ce cadre, l'observation des modifications vasculaires précède de plusieurs mois l'apparition des altérations neuronales, suggérant qu'elles sont une conséquence des dysfonctions vasculaires. Les altérations neurovasculaires sont de plus en plus documentées dans la littérature (*Quaeghebeur et al.*, 2010; *Zlokovic*, 2008). Ces résultats suggèrent que les désordres vasculaires pourraient donc être à l'origine des processus neurodégénératifs, et mettent en avant le rôle des péricytes jusque-là ignoré dans ces considérations. Des modifications histopathologiques de la BHE, incluant des modifications des péricytes, sont observés dans la maladie d'Alzheimer (*Zipser et al.*, 2007). Certains auteurs suggèrent qu'un dysfonctionnement des mécanismes d'élimination au niveau de la BHE pourrait conduire à l'accumulation des peptides β -amyloïdes (peptide A β) dans le cerveau des patients atteints de cette pathologie (*Deane et al.*, 2004; *Zlokovic et al.*, 2005) : on parle d' « hypothèse neurovasculaire »

(Bell et Zlokovic, 2009).

Des études *in vitro* sur des péricytes humains ont démontré leur capacité à internaliser le peptide A β , et ont indiqué une possible contribution du récepteur LRP1 dans l'internalisation du peptide A β par ce type cellulaire (Wilhelmus *et al.*, 2007). Selon les auteurs, l'expression de ce récepteur dans les péricytes et dans les CMLs pourrait contribuer à la formation de l'angiopathie amyloïde cérébrale au niveau des parois des vaisseaux : l'internalisation de l'A β par les péricytes et les CMLs serait un processus physiologique de protection. La saturation de ce mécanisme d'internalisation pourrait mener aux dépôts de ces peptides et à leur toxicité. Cependant, il existe d'autres hypothèses selon lesquelles la présence de peptides A β dans les péricytes est en partie due à une production vasculaire : les péricytes sont capables de produire le précurseur du peptide A β (Verbeek *et al.*, 2002). De plus, des fibrilles amyloïdes sont retrouvées dans leurs vésicules cytoplasmiques et dans leur matrice extracellulaire (Verbeek *et al.*, 2002). Tous ces arguments renforcent l'idée d'un rôle important des péricytes dans le métabolisme cérébral des peptides A β , mais des études supplémentaires sont nécessaires afin de clarifier leur rôle exact dans ce processus.

Alors que certains chercheurs utilisent les modèles cellulaires de BHE pour comprendre la mise en place et le comportement des différents éléments qui la constituent en conditions physiologiques et pathologiques, d'autres les utilisent afin d'optimiser le transport d'agents thérapeutiques à travers la BHE.

3.2 Optimisation du passage de molécules à travers la BHE

Les propriétés restrictives de la BHE font d'elle un obstacle majeur à l'entrée dans le cerveau de nombreuses molécules thérapeutiques et donc au traitement des maladies du SNC. Afin de contourner le problème lié au passage à travers la BHE, des voies d'administration n'empruntant pas la circulation sanguine ont été proposées comme l'administration intranasale, intracérébroventriculaire ou encore intracérébrale. Toutefois elles ne permettent pas de traiter efficacement la majorité des pathologies cérébrales, puisque les composés ainsi administrés n'atteignant qu'une partie réduite du tissu cérébral. À l'inverse, mettre à profit la richesse du réseau de capillaires cérébraux en administrant le traitement *via* la circulation sanguine cérébrale permettrait de le traiter de manière plus globale. Le développement de stratégies permettant de vectoriser des agents thérapeutiques à travers la BHE représente donc un enjeu majeur pour l'élaboration de nouveaux traitements. Des approches chimiques et biologiques ont été mises en place dans ce cadre (Figure 32) : alors que la première catégorie tente

de favoriser la diffusion passive des composés en modifiant leurs propriétés physicochimiques, la seconde module la perméabilité ou met à profit les systèmes de transport présents au niveau de la BHE, tels que la transcytose (Gabathuler, 2010; Misra *et al.*, 2003).

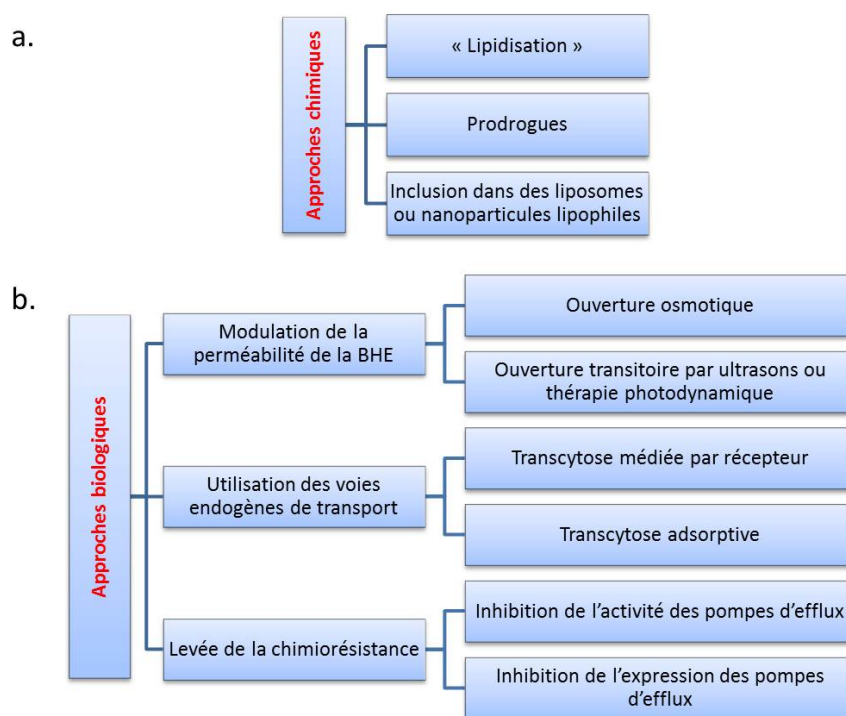


Figure 32 – Les approches chimiques (a.) et biologiques (b.) afin d'optimiser le passage de molécules à travers la BHE. Modifié de Pardridge (2003).

3.2.1 Approches chimiques

Pour faciliter le passage d'une molécule à travers la BHE, trois stratégies peuvent être adoptées (Figure 32a) :

- la « **lipidisation** », qui consiste à synthétiser un analogue actif qui soit plus lipophile que la molécule d'origine (Pardridge, 2007).
- la synthèse de **prodrogues**, c'est-à-dire la liaison covalente temporaire de la molécule active à un groupement susceptible de favoriser son passage à travers la BHE. Arrivée dans le compartiment ciblé (le parenchyme cérébral), la prodrogue doit être clivée pour permettre la libération de la molécule active à son site d'action (Rautio *et al.*, 2008) (Figure 33).
- l'inclusion de la molécule active dans des **nanoparticules lipophiles** ou des **liposomes** (Fenart *et al.*, 1999; Kreuter, 2001).

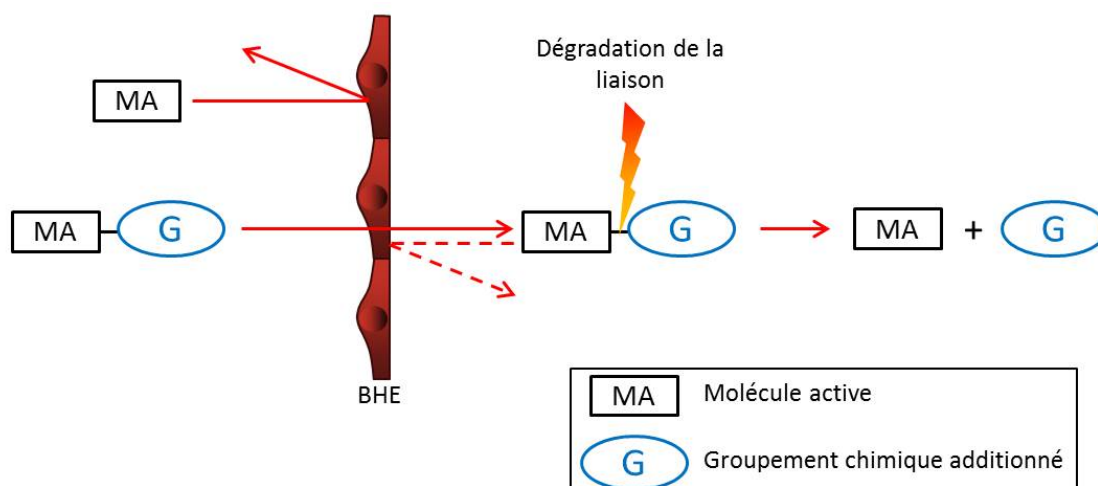


Figure 33 – **Principe des prodrogues.** Modifié de [Rautio et al. \(2008\)](#).

Les prodrogues sont des dérivés de molécules thérapeutiques qui doivent subir une transformation enzymatique ou chimique permettant la libération de la molécule active dans l'organisme, afin qu'elle puisse exercer son action pharmacologique à son site cible. Considérons l'exemple d'une molécule active (MA) d'intérêt dans une pathologie du SNC, qui n'est pas capable de traverser la BHE. En lui ajoutant un groupement chimique approprié (G), il est possible de permettre son passage à travers la BHE. Arrivée au niveau du SNC, la prodrogue est clivée pour permettre la libération de la molécule active, qui doit rester dans le compartiment cérébral pour pouvoir exercer son action.

En permettant l'étude rapide de la perméabilité à travers la BHE, les modèles *in vitro* ont largement contribué au développement de ces approches. Cependant, l'utilisation de ces stratégies purement chimiques présente des inconvénients : en augmentant la lipophilie des molécules il est possible d'entraîner une diminution de l'effet thérapeutique à cause d'une activité réduite, voire induire une toxicité ([Rautio et al., 2008](#)). L'augmentation du poids moléculaire des composés ainsi générés peut défavoriser leur diffusion. De même, l'augmentation de la lipophilie peut en effet améliorer le passage d'une molécule à travers la BHE, mais aussi à travers toutes les membranes biologiques, et favoriser la liaison de la molécule aux protéines plasmatiques et au tissu cérébral de manière non spécifique, entraînant une diminution de sa concentration libre (et donc potentiellement active) à son site d'action ([Friden et al., 2007](#); [Jeffrey et Summerfield, 2007](#); [Summerfield et al., 2006](#)).

Puisque ces méthodes purement chimiques n'ont pas eu le succès escompté, les stratégies actuelles s'orientent donc de plus en plus vers les approches biologiques.

3.2.2 Approches biologiques

Parmi les approches biologiques (Figure 32b) certaines n'ont cours qu'*in vivo*. Par exemple, l'utilisation de solutions hypertoniques ou de composés vasodilatateurs permettent d'augmenter transi-

toirement mais non spécifiquement la perméabilité de la BHE. Cette méthode de **modulation de la perméabilité** de la BHE est parfois utilisée chez l'Homme pour le traitement d'une tumeur cérébrale (Hashizume et Black, 2002). De la même manière l'ouverture transitoire de la BHE par ultrasons ou thérapie photodynamique - mise au point récemment - est testée *in vivo* (Marquet *et al.*, 2011; Meairs et Alonso, 2007). En revanche, les modèles cellulaires de BHE sont très utiles dans le cadre d'études concernant la mise à profit des voies endogènes de transport - dont de nombreuses modalités ont été décrites *in vitro* - en permettant notamment d'évaluer l'efficacité de la vectorisation. En outre les modèles *in vitro* de BHE, présentant une forte restriction du passage paracellulaire et l'expression de pompes d'efflux, permettent d'étudier l'efficacité de l'inhibition de ces transports d'efflux sur le passage de composés.

3.2.2.1 Mise à profit des voies endogènes de transport

Cette approche profite de l'existence au niveau de la BHE de voies endogènes de transport dépendant soit de transporteurs membranaires, soit de phénomènes transcytotiques (transcytose dépendante d'un récepteur et transcytose adsorptive) (Pardridge, 2003; Potschka, 2010b). Le principe consiste à modifier le composé d'intérêt ou à le coupler à une molécule afin qu'il (ou l'ensemble) devienne substrat du système de transport ciblé.

Par exemple l'administration de dopamine a été envisagée pour traiter la maladie de Parkinson, qui est associée à un déficit en ce neurotransmetteur, mais cette catécholamine traverse peu la BHE. En revanche la L-3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA), un précurseur de la dopamine, est transportée au niveau de la BHE *via* le *large neutral amino acid transporter-1* (LAT-1). Arrivée dans le SNC, elle est métabolisée par la DOPA-décarboxylase en dopamine. Cette stratégie, utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson depuis plus de 35 ans (Mena et Cotzias, 1975), combine donc le principe de la prodrogue et la prise en charge par un transporteur. De la même manière, GLUT-1 permet le transport d'analogues de la met-enképhaline à travers la BHE (Polt *et al.*, 1994). Toutefois, ce type d'approche souffre de la compétition de la molécule d'intérêt avec les substrats endogènes du transporteur ciblé, ce qui peut limiter l'efficacité du traitement.

L'existence d'un transport vésiculaire au niveau de la BHE inspira l'idée d'exploiter cette voie pour le passage de molécules thérapeutiques à travers la BHE (Wang *et al.*, 2009). De nombreux modèles *in vitro* ont permis d'étudier et de caractériser les mécanismes de transport existant au niveau de la BHE (Roux et Couraud, 2005).

Par exemple, le modèle de coculture développé dans notre laboratoire exprime le récepteur à la transferrine, permettant l'internalisation de cette dernière au niveau des cellules endothéliales de la BHE (Descamps *et al.*, 1996; Fenart et Cecchelli, 2003). Les résultats obtenus indiquent que 75% de la transferrine endocytée par les cellules endothéliales atteignent le compartiment abluminal, permettant l'approvisionnement du SNC en fer. Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle la transferrine endocytée n'est pas dégradée mais transférée, avec le fer qu'elle porte, dans le compartiment abluminal (Fishman *et al.*, 1987; Pardridge *et al.*, 1991). Ainsi, la majorité du fer endocyté par les cellules endothéliales cérébrales n'est pas destinée à sa propre consommation mais à celle des cellules du SNC.

L'utilisation du même modèle a permis d'étudier le transport des LDLs, qui prennent en charge les acides gras et le cholestérol dans la circulation sanguine, à travers la BHE. Le récepteur des LDLs (récepteur apo B/E), dont l'expression est modulée par la présence des astrocytes (Dehouck *et al.*, 1994), a été mis en évidence par Méresse *et al.* (1989). Les résultats obtenus par Dehouck *et al.* (1997) et Candela *et al.* (2008) démontrent que les cavéoles sont impliquées dans le transport des LDLs au travers de la BHE. La fixation des LDLs s'accompagne d'une internalisation du récepteur dans les cellules endothéliales. Ensuite, les LDLs sont libérées du côté abluminal sans subir de dégradation par le système lysosomal (Dehouck *et al.*, 1997). Cette voie permettrait donc l'apport de cholestérol, d'acides gras poly-insaturés et d'autres lipides au niveau du SNC.

L'utilisation des **voies spécifiques de transcytose** pour transporter des molécules d'intérêt thérapeutique ciblent notamment les récepteurs de la transferrine (Pardridge, 2007), des LDLs (Hülsermann *et al.*, 2009) ou encore de l'insuline (Wu et Pardridge, 1998). Pour cela la molécule active est couplée soit à un substrat présentant une forte affinité pour le récepteur, soit à un anticorps spécifique du récepteur. L'anticorps monoclonal OX26, dirigé contre le récepteur de la transferrine, a ainsi été utilisé pour transporter le *nerve growth factor* (NGF) vers le parenchyme cérébral (Friden *et al.*, 1993). Ce même anticorps a aussi été couplé à des liposomes chargés de daunomycine, menant à la formation de macromolécules appelées « immunoliposomes » (Huwyler *et al.*, 1996) : cette construction permet à la daunomycine d'atteindre spécifiquement et en quantité plus importante le SNC par rapport à la daunomycine injectée par voie intraveineuse seule ou associée à des liposomes stabilisés ou non avec du poly-éthylène glycol (PEG) (Figure 34). La transcytose de ces immunoliposomes a été démontrée *in vitro* et *in vivo* chez le rat (Cerletti *et al.*, 2000). En chargeant ces immunoliposomes avec un plasmide, il a été possible d'induire l'expression de β -galactosidase au

sein du SNC, notamment au niveau neuronal (Shi *et al.*, 2001).

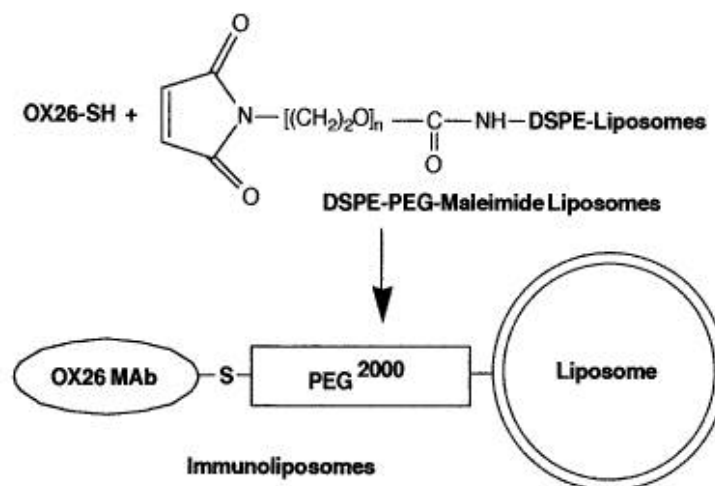


Figure 34 – **Immunoliposomes associés à l’anticorps OX-26 ciblant le récepteur de la transferrine.** D’après Huwyler *et al.* (1996). Le couplage de l’anticorps monoclonal OX-26 à des liposomes permet la formation d’immunoliposomes ciblant le récepteur de la transferrine. Dans cet exemple, les liposomes sont stériquement stabilisés par le PEG (sous la forme de PEG-distearoylphosphatidylethanolamine-maléimide ou DSPE-PEG-Maleimide sur la figure). La liaison de l’anticorps au PEG²⁰⁰⁰ (2000 Da) est permise par la formation d’un pont disulfure, car une fonction thiol (-SH) a été ajoutée à l’anticorps OX-26. En chargeant ces liposomes avec un médicament, telle que la daunomycine, il est possible d’augmenter significativement son passage vers le parenchyme cérébral par rapport à la daunomycine injectée par voie intraveineuse seule ou associée à des liposomes non couplés (stabilisés ou non avec du PEG).

La **transcytose adsorptive** a aussi inspiré d’autres stratégies de vectorisation : puisque cette voie est majoritairement empruntée par des molécules cationiques, la « cationisation » de protéines a été utilisée (Herve *et al.*, 2008). Elle consiste à coupler la protéine d’intérêt à des polyamines comme le hexaméthylènediamine (HMD) (synthétique) ou la putrescine, la spermidine et la cadavérine (polyamines naturelles). Cette modification covalente a démontré son efficacité en augmentant significativement le passage de protéines ainsi couplées à travers la BHE *in vitro* et *in vivo* (Bickel *et al.*, 2001). D’autres stratégies basées sur la transcytose adsorptive comprennent l’utilisation de liposomes cationiques (Fenart *et al.*, 1999; Voinea et Simionescu, 2002) et des *cell-penetrating peptides* tels que les peptides Tat, la pénétratine ou les vecteurs Syn-B. En couplant ces peptides (qui font l’objet d’une transcytose adsorptive) avec la molécule d’intérêt, il serait possible de traverser la BHE, mais peu de données existent à ce sujet et, faisant appel à un processus non-spécifique, ils ne ciblent pas spécifiquement la BHE dans l’organisme (Herve *et al.*, 2008).

Plusieurs approches utilisant le transport dépendant de récepteurs (récepteur de la transferrine, de l’insuline et des LDLs) ou la transcytose adsorptive afin de cibler le parenchyme cérébral sont récemment entrées en phase pré-clinique et clinique (Gabathuler, 2010).

3.2.2.2 Levée de la pharmacorésistance

Puisque les transporteurs d'efflux sont connus pour restreindre le passage de nombreux composés à travers la BHE, il est apparu intéressant d'inhiber leur activité ou leur expression pour favoriser l'entrée de molécules thérapeutiques vers le parenchyme cérébral. Cette approche serait particulièrement intéressante dans le cadre de certaines affections cérébrales telles que l'épilepsie, qui sont témoins d'une surexpression de transporteurs d'efflux. Cette surexpression est responsable d'un phénotype de pharmacorésistance problématique qui empêche leur traitement efficace (Potschka, 2010a). D'autre part la P-gp, exprimée au niveau de la BHE et présentant un très large spectre de substrats, est tenue pour responsable de l'échec du traitement des tumeurs cérébrales par chimiothérapie.

Sachant que certains substrats partagent le même site de fixation au niveau de la P-gp, ils peuvent donc entrer en compétition pour se fixer sur elle : cette inhibition compétitive peut être mise à profit pour moduler le transport de composés. Des études menées *in vivo* et *in vitro* ont démontré l'efficacité de cette technique pour augmenter le passage de composés à travers la BHE (Fenart *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 2009). Un autre mode d'action que l'inhibition compétitive repose sur le fait que certains agents modulateurs, en se fixant sur la P-gp, entraînent un changement de sa conformation et empêche ainsi la fixation du substrat.

Une autre méthode consiste à moduler non pas l'activité mais l'expression des transporteurs d'efflux : certains modulateurs pouvaient agir directement sur la transcription du gène codant pour la P-gp (Joly *et al.*, 1996). En effet, en présence de vérapamil, le taux d'ARN_m codant pour la P-gp dans des cellules tumorales humaines est fortement diminué. L'étude menée par van Vliet *et al.* (2010) indique qu'une inhibition de la voie de la cyclooxygénase 2 empêche la surexpression de la P-gp chez des rats présentant un statut épileptique, et permet de maintenir l'apport de la phénytoïne (anti-épileptique substrat de la P-gp) au niveau cérébral. Cette stratégie pourrait donc être prometteuse pour contrer la chimiorésistance associée à l'épilepsie.

Ces pompes d'efflux sont également exprimées dans d'autres tissus. La P-gp, par exemple, participe aux fonctions d'élimination au niveau rénal. Les stratégies dirigées spécifiquement contre la BHE sont donc à privilégier pour limiter les risques d'effets secondaires.

3.3 Études du transport de molécules à visée thérapeutique à travers la BHE lors des étapes précoces du processus de découverte des médicaments

La BHE est tenue pour responsable, au moins en partie, de l'échec de nombreux médicaments à visée cérébrale lors de la découverte de médicaments. En effet, pour qu'un composé puisse efficacement exercer son activité thérapeutique au sein du SNC, il est nécessaire qu'il atteigne une certaine concentration à son site d'action, et pendant un temps suffisamment long pour lui permettre d'agir au niveau de sa cible. Les propriétés pharmacocinétiques d'un composé à visée cérébrale dépendent de plusieurs facteurs, notamment sa concentration libre dans le plasma et au niveau du parenchyme cérébral, et son passage à travers la BHE, puisqu'elle représente la principale voie d'accès au parenchyme cérébral. Dans l'industrie pharmaceutique, différentes techniques sont utilisées pour étudier le transport de composés à travers la BHE, qui vont des méthodes *in silico* aux méthodes *in vivo* en passant par les modèles cellulaires (Abbott, 2004; Bickel, 2005). Certaines de ces méthodes ont été décrites dans le chapitre précédent, et leur utilisation dépend du stade dans le processus de découverte de médicaments.

Lors des étapes les plus précoces, alors que de très nombreuses molécules doivent être criblées, les méthodes *in silico* sont privilégiées, et permettent notamment de classer les composés en fonction de leur diffusion passive. L'utilisation d'autres techniques est ensuite nécessaire pour confirmer ces prédictions puisque, comme nous l'avons vu précédemment, la perméabilité à travers la BHE ne dépend pas uniquement de ce phénomène (Mertsch et Maas, 2002). La technique de la perfusion cérébrale *in situ* est la méthode la plus adaptée pour étudier la perméabilité de la BHE *in vivo*, mais puisqu'elle est difficile à mettre en œuvre et coûteuse elle n'est pas très utilisée dans l'industrie pharmaceutique, au moins dans les étapes précoces du processus de découverte de médicaments (Reichel, 2006). Les modèles *in vitro* de BHE, qui sont quant à eux plus aisés à mettre en œuvre et présentent des débits plus élevés, sont donc préférés à cette méthode *in vivo*. Les modèles bovins et porcins sont parmi les plus utilisés, mais leur mise en place et leur maintien nécessitent du temps, de l'expérience et des ressources techniques non négligeables, ce qui explique que peu de sociétés pharmaceutiques dédient une équipe à cette tâche (Reichel, 2006). En effet, choisir un modèle *in vitro* parmi tous ceux disponibles nécessite de faire un compromis entre un modèle dont la mise en œuvre est aisée et la prise en considération de la majorité des caractéristiques de la BHE.

La stratégie choisie consiste donc souvent à en utiliser plusieurs selon les nécessités de l'investigation : des modèles non cellulaires et des modèles cellulaires basés sur les lignées d'origine non

cérébrale sont utilisés lors de des étapes très précoces car ils permettent un criblage à haut débit, alors que l'utilisation de cultures primaires ou secondaires de cellules endothéliales en coculture avec des astrocytes est réservée aux étapes un peu plus avancées, quand la plus grande partie des propriétés de la BHE doit être prise en compte. La plupart des programmes de recherche intègrent ces modèles de criblage *in vitro* dans un processus de sélection incluant l'utilisation de modèles *in silico* en amont et *in vivo* en aval.

Face au besoin de l'industrie pharmaceutique d'un modèle *in vitro* de BHE fiable, prédictif et aisé à mettre en œuvre, Culot *et al.* (2008) ont développé un modèle adapté au criblage rapide de molécules, sur la base du modèle de coculture de Dehouck *et al.* (1990). Son format réduit (24 puits au lieu de 6 puits), un temps de culture réduit (4 jours au lieu de 12) et l'utilisation d'un milieu inducteur à la place des cellules gliales en coculture lui permettent d'être facilement utilisable en routine, faisant de ce modèle un support potentiel des programmes de recherche des industries pharmaceutiques. Dans ces programmes certaines étapes visent à évaluer la toxicité des molécules afin de prévenir les risques associés, comme les instances gouvernementales le préconisent pour les composés chimiques.

3.4 Évaluation de la toxicité

La toxicologie correspond à l'étude des effets nocifs d'agents chimiques, biologiques ou physiques sur les organismes (ou les écosystèmes), fournissant une base scientifique à la compréhension et à l'estimation des effets toxiques. En procurant des informations pertinentes, elle doit permettre aux agences gouvernementales d'établir des règles de sécurité et d'exposition à ces agents, qu'il s'agisse de produits chimiques ou cosmétiques, de médicaments, d'additifs alimentaires, de pesticides et autres polluants. Pour déterminer et mesurer le risque lié à ces substances sont utilisés des tests de toxicité. Ces tests doivent pouvoir répondre aux questions suivantes : à quelle dose le composé est-il toxique, suite à une exposition aiguë ou chronique ? Le composé est-il carcinogène ou mutagène ? Est-il irritant ? Comment est-il absorbé, distribué, métabolisé et excrété au sein de l'organisme ? Est-il toxique pour le système nerveux mature et en développement ?

3.4.1 Détection de la neurotoxicité

La détection de la neurotoxicité comprend l'étude de la toxicité induite au niveau du SNC et du système nerveux périphérique. Les autorités réglementaires, telles que l'Organisation de Co-

opération et de Développement Économiques (OCDE) et l'*Environmental Protection Agency* (EPA), valident uniquement des méthodes *in vivo* pour déterminer la toxicité de composés sur le système nerveux, qui se basent principalement sur l'évaluation de fonctions cognitives, sensorielles et motrices et sur des études neuropathologiques. Aujourd'hui les méthodes *in vitro* sont généralement utilisées pour étudier les mécanismes de toxicité plutôt que pour la détecter, et jouent donc surtout un rôle complémentaire à celui des modèles *in vivo* (Bal-Price *et al.*, 2010).

Cependant, des dispositifs réglementaires ont récemment été entérinés et obligent à déterminer la toxicité - et notamment la neurotoxicité - d'un très grand nombre de molécules. Ainsi, depuis le 1^{er} juin 2007, la nouvelle réglementation européenne pour l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des produits chimiques (REACH), qui vise à améliorer la connaissance et la maîtrise des risques que représentent les substances chimiques, oblige les producteurs et importateurs de ces substances - dont le tonnage excède une tonne par an - à apporter la preuve de l'innocuité pour la santé ou de la maîtrise des risques associés d'ici à 2018. Van der Jagt *et al.* (2004) avaient estimé qu'en absence de recours à des méthodes alternatives, environ 3,9 millions d'animaux (dont 2,6 millions de vertébrés) seraient nécessaires afin de tester la toxicité des quelques 30.000 substances prévues. Le nombre de ces substances a récemment été réévalué à 68.000 au minimum, et le nombre d'animaux vertébrés nécessaires aux études *in vivo* atteindrait 54 millions (Rovida et Hartung, 2009). Ce chiffre apparaît inacceptable tant d'un point de vue financier qu'éthique, remettant en question même la faisabilité du programme (Rovida et Hartung, 2009). Ces chiffres soulignent l'importance et l'urgence de mettre à profit de nouvelles méthodes à haut débit permettant d'économiser des vies animales. Afin de limiter le recours à l'expérimentation *in vivo*, une première décision avait déjà été prise en 2004 lors de la promulgation de la directive européenne sur les essais concernant l'innocuité des produits cosmétiques, obligeant les industriels de ce secteur à éliminer, dans un délai de dix ans, tout recours aux essais sur les animaux pour réaliser leurs analyses et donc à utiliser des **méthodes alternatives**.

Dans le contexte des tests de toxicité, les alternatives à l'expérimentation animale visent notamment à Remplacer (*Replace*) les animaux, à Réduire (*Reduce*) le nombre d'animaux utilisés et à Réformer (*Refine*) les techniques mises en œuvre pour minimiser la douleur, la souffrance et le stress subis par ces animaux. On parle du concept des 3Rs, qui trouve son origine en 1959 dans la publication « *The Principles of Humane Experimental Technique* » (Russell et Burch, 1959) ; depuis, beaucoup d'argent a été investi par les gouvernements, les corporations et autres acteurs dans le but de privilégier des méthodes alternatives. Celles-ci incluent :

- les systèmes *in silico*, dont les *quantitative structure-activity relationships* (QSARs), afin de prédire les propriétés biologiques d'une molécule à partir de sa structure chimique, et les systèmes visant à prédire sa toxicité (comme DEREK) ou son devenir métabolique (comme METEOR) à partir de cette même donnée (Greene *et al.*, 1999; Marchant *et al.*, 2008).
- les cultures cellulaires et tissulaires *in vitro*. Même si une combinaison de tests *in vitro* pourrait permettre d'identifier les risques spécifiques aux composés neurotoxiques, permettant d'améliorer l'évaluation et la prédictibilité de la neurotoxicité humaine, ils doivent subir un processus d'évaluation pour prouver qu'ils sont robustes et adaptables au criblage à haut débit. L'utilisation de tests de neurotoxicité *in vitro*, seuls ou intégrés dans une batterie de tests mécanistiques *in vitro*, accélérerait le processus d'évaluation en donnant des données mécanistiques sur la toxicité induite par le produit chimique en question. Des alternatives aux modèles animaux d'évaluation de la neurotoxicité sont en cours de validation auprès de l'*European Center for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) (Coecke *et al.*, 2007).

3.4.2 Modèles *in vitro* de BHE et détermination de la neurotoxicité

L'ECVAM, créé en 1991, a notamment pour mission de valider des méthodologies alternatives à l'expérimentation animale. Mandatée par l'Union Européenne pour répondre aux besoins croissants suscités par le renforcement des règles de sécurité toxicologique, l'ECVAM a organisé en 2003 un atelier de réflexion sur l'utilisation des modèles *in vitro* de BHE dans le but d'évaluer l'innocuité ou l'éventuelle toxicité des substances chimiques. Les conclusions de cet atelier indiquent que ces modèles peuvent contribuer d'une part à améliorer la pertinence des modèles toxicocinétiques existants, et d'autre part à évaluer les effets néfastes des composés chimiques sur le maintien de l'homéostasie du SNC (Prieto *et al.*, 2004).

En effet, l'évaluation de la toxicité de produits passe par une étude de leur **toxicocinétique**, c'est-à-dire par une description qualitative et quantitative de leur devenir au sein de l'organisme, qui est déterminé par quatre processus : l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion du composé en question. En fournissant ces informations, cette étude permet l'établissement d'une relation entre la concentration ou la dose et la toxicité observée, et aide à comprendre le mécanisme de toxicité. Pour ce faire, l'expérimentation recueille des données de distribution spatiale et temporelle de la substance dans l'organisme étudié (par exemple, des mesures de concentration sanguine à différents temps). Ensuite, la construction de modèles mathématiques paramétrés (appelés

« modèles toxicocinétiques ») permettent de caractériser la relation entre l'exposition et la quantité interne de toxique. Des traitements statistiques appropriés permettent d'ajuster ces modèles à l'aide des données expérimentales.

Puisque la BHE représente la principale voie d'accès des molécules présentes dans le sang au SNC, elle joue un rôle dans leur distribution au niveau cérébral. Dans le cadre du test de nouvelles molécules chimiques présentant un mécanisme de toxicité inconnu, les modèles *in vitro* de BHE devraient être incorporés dans les études toxicocinétiques pour déterminer la capacité de pénétration cérébrale du composé (Prieto *et al.*, 2004). Cependant, les modèles utilisés doivent être suffisamment prédictifs tout en étant adaptables au criblage à haut débit : le modèle *in vitro* de BHE développé par Culot *et al.* (2008), adapté au criblage rapide de molécules, a l'avantage d'inclure les aspects métaboliques de la BHE telle que la présence de transporteurs d'efflux, contrairement aux modèles *in silico*.

De plus, il est essentiel de déterminer si un composé a un **effet toxique sur les composants de la BHE**, pouvant résulter en une altération de son intégrité et donc de son rôle protecteur, induisant une neurotoxicité indirecte. Le modèle développé par Culot *et al.* (2008) permet aussi, en co-incubant le composé avec un marqueur d'intégrité de la BHE dont la perméabilité sera calculée, de déterminer la toxicité de la molécule vis-à-vis des cellules endothéliales formant la BHE. Ce modèle a d'ailleurs été mis au point dans le cadre du programme Acute-Tox (FP6, 2005-2010), qui s'intéresse aux méthodes alternatives susceptibles de remplacer les procédures actuelles menées *in vivo* pour l'évaluation de la toxicité systémique aiguë. De plus, en combinant un modèle de BHE et une culture-cible, telle que des neurones ou des cellules gliales, il est possible d'obtenir en même temps des données concernant la perméabilité et la toxicité d'un composé sur la BHE, ainsi que sur sa toxicité sur les cellules-cibles après passage à travers la BHE (Hallier-Vanuxeem *et al.*, 2009). Les informations obtenues à l'aide de ces modèles peuvent être intégrées aux modèles toxicocinétiques.

3.5 La BHE en tant que cible thérapeutique : implication dans l'étape de validation des cibles pharmacologiques

Une dysfonction de l'endothélium vasculaire cérébral a pu être observée dans de nombreuses maladies du SNC, dont des affections neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques et la maladie de Parkinson, mais aussi dans l'ischémie cérébrale, l'épilepsie, les gliomes et

tumeurs cérébrales métastatiques, les traumatismes cérébraux ou encore l'encéphalopathie associée au Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise (SIDA) (Abbott *et al.*, 2010; Zlokovic, 2008).

Que cette dysfonction soit une cause ou une conséquence de l'apparition des pathologies en question n'est pas toujours établi, mais dans tous les cas des lésions ou perturbations de la BHE peuvent au moins contribuer à leur développement (Persidsky *et al.*, 2006). Arrêter ou ralentir l'évolution de la composante vasculaire au cours de l'affection peut permettre, au mieux, de traiter la maladie, ou de ralentir sa progression : le développement de stratégies permettant de restaurer ou de protéger les fonctions de la BHE pourrait permettre de maintenir l'homéostasie cérébrale et donc de protéger les cellules neuronales et gliales en conditions pathologiques.

Les modèles *in vitro* de BHE constituent une approche intéressante dans le cadre de l'étude des réponses de l'endothélium cérébral en conditions pathologiques. Par exemple, en mimant l'ischémie sous la forme d'une OGD, il est possible d'observer les phénomènes d'ouverture de la BHE en réponse à ce stress (Brillault *et al.*, 2002; Mysiorek *et al.*, 2009; Plateel *et al.*, 1997), tout en s'affranchissant de la complexité inhérente à l'*in vivo*. En incubant les cellules cibles avec un agent thérapeutique potentiel, ces modèles permettent d'observer l'effet protecteur du traitement sur la BHE et donc de pré-valider une stratégie *in vitro*.

Ainsi, une équipe a pu étudier le mécanisme responsable de l'absence de l'effet protecteur des glucocorticoïdes lors des AVCs à l'aide d'un modèle *in vitro* de BHE soumis à une OGD, et proposer une stratégie thérapeutique dont ils ont confirmé l'effet protecteur *in vivo*. En effet, ils ont observé *in vitro* que l'OGD induit une ouverture de la BHE mais qu'un traitement à la dexaméthasone ne permet pas de restaurer sa fonction, alors qu'il y a dégradation du récepteur aux glucocorticoïdes par le protéasome dans ces conditions. En revanche, l'inhibition du protéasome permet l'effet stabilisateur du traitement en conditions ischémiques. *In vivo*, les souris soumises à une ischémie transitoire puis traitées avec une combinaison incluant un glucocorticoïde et un inhibiteur du protéasome présentent des déficits moindres et des œdèmes réduits par rapport aux souris témoins, alors que chaque traitement pris seul n'a pas d'effet protecteur, confirmant les résultats obtenus *in vitro* (Kleinschnitz *et al.*, 2011). Les résultats de Culot *et al.* (2009) ont quant à eux démontré, à l'aide d'un modèle *in vitro* placé en conditions ischémiques (OGD), que l'effet neuroprotecteur du nitroène disodium 2,4-sulphonyl-N-tert-butylnitroène (NXY-059) observé *in vivo* dans les études précliniques pouvait - au moins en partie - être imputable à son influence protectrice vis-à-vis de la BHE.

Des animaux transgéniques, invalidés pour une cible thérapeutique potentielle, peuvent permettre de mettre en place des modèles *in vitro* de BHE utilisables dans le cadre des étapes de validation de cibles pharmacologiques. En effet, en comparant l'effet d'un agent thérapeutique sur les cellules endothéliales cérébrales issues de souris sauvages et celles issues des animaux invalidés, il est possible de valider des cibles moléculaires sensées être impliquées dans une pathologie cérébrale, et d'étudier la fonction thérapeutique d'un agent pharmacologique (Mysiorek *et al.*, 2009).

Les modèles *in vitro* de BHE peuvent donc constituer des outils intéressants pour évaluer l'effet protecteur de stratégies thérapeutiques vis-à-vis de la BHE en conditions pathologiques, et pour valider des cibles moléculaires potentielles. Les modèles d'études de la BHE, et en particulier les modèles cellulaires, ont donc de nombreuses d'applications dans l'industrie pharmaceutique lors du processus de découverte et de développement de médicaments à visée cérébrale (Figure 35).

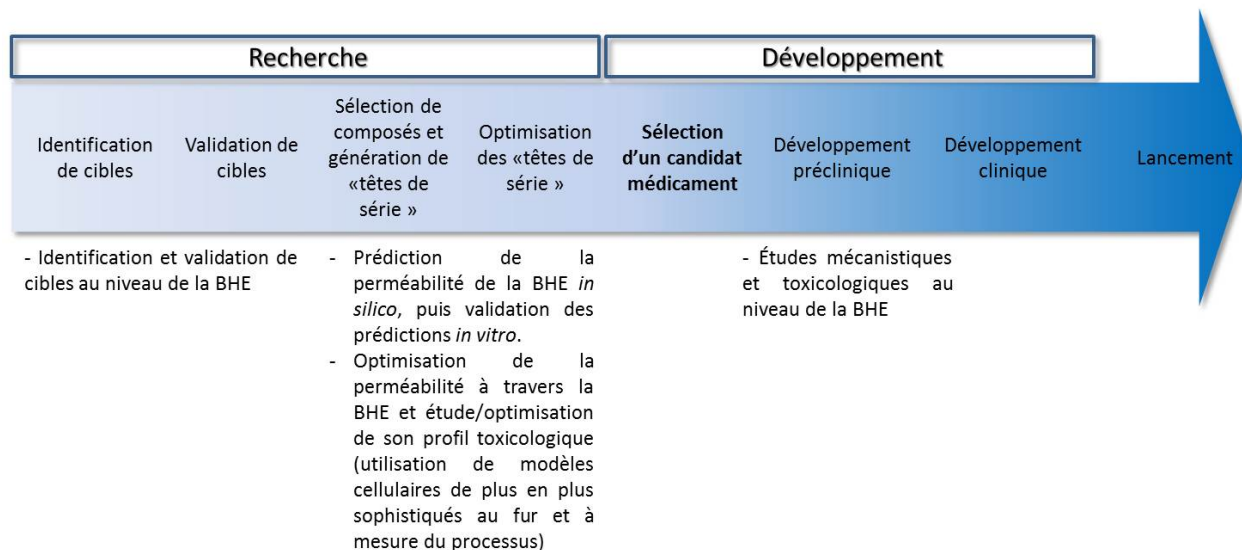


Figure 35 – Les applications des modèles de BHE lors des processus de découverte et de développement de médicaments. Modifié de [Cecchelli et al. \(2007\)](#).

Les applications possibles des modèles de BHE lors des différentes étapes de la découverte et de développement de médicaments sont indiquées sous la flèche. L'identification et la validation de cibles consistent à choisir, évaluer et valider une cible biologique impliquée dans un processus pathologique (un récepteur, une enzyme ou un gène par exemple). Il s'agit alors d'identifier une molécule capable de modifier l'activité de cette cible. Les modèles *in vivo* et cellulaires de BHE, basés sur des animaux sauvages et mutés pour la cible, peuvent être utilisés pour valider une cible biologique impliquée dans la fonction de l'endothélium cérébral. Les phases suivantes consistent à :

- identifier des molécules interagissant avec la cible. Pour cela des criblages à haut débit de molécules sont développés et validés en fonction de la cible. Des modèles *in silico* de BHE y sont souvent utilisés pour évaluer rapidement la perméabilité de la BHE pour les molécules produites. Les molécules sélectionnées peuvent alors être testées *in vitro* pour confirmer les prédictions *in silico*.

- générer et optimiser des molécules présentant une affinité optimale pour la cible (appelées «têtes de série») et des caractéristiques optimales permettant leur action pharmacologique. L'étude des relations structure-activité et l'optimisation des propriétés pharmacologiques (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) et toxicologiques des composés en font partie. Différents modèles cellulaires de la BHE sont utilisés pour évaluer l'impact des modifications chimiques apportées à une molécule et rendre des informations aux chimistes médicaux pour leur permettre d'optimiser les propriétés gouvernant la pénétration cérébrale. Il y a aussi un intérêt croissant lors de cette phase à utiliser des modèles cellulaires *in vitro* de BHE pour l'évaluation précoce de la toxicité des composés, afin de minimiser le risque d'échec à des étapes plus tardives.

Dans la phase de développement, après qu'un candidat médicament ait été sélectionné, les modèles cellulaires de BHE peuvent par exemple être utilisés pour comprendre des mécanismes d'action ou tester des aspects toxicologiques particuliers.

Conclusion de l'étude bibliographique

L'endothélium des capillaires cérébraux présente des caractéristiques qui le distinguent des endothélia périphériques telles que la présence de jonctions serrées, l'absence de fenestration et la rareté du transport vésiculaire, ainsi que l'expression de transporteurs d'efflux et d'enzymes de dégradation. Ces propriétés font de cet endothélium le siège de la BHE, responsable du maintien de l'homéostasie cérébrale. Les interactions cellulaires et moléculaires responsables de la formation et du maintien de cette structure complexe commencent seulement à être élucidés, et impliquent l'intervention des autres types cellulaires de l'UNGV : les péricytes, les cellules gliales et les neurones. Pour étudier ces interactions les études *in vitro* permettent des investigations qui ne seraient pas aisées *in vivo*, mais dans cette optique les modèles utilisés doivent reproduire le plus fidèlement possible les caractéristiques de la BHE *in vivo*, ce qui implique parfois de les rendre plus complexe. À la lumière des données indiquant que les péricytes cérébraux jouent un rôle important dans la mise en place et le maintien des propriétés de la BHE, il apparaît aujourd'hui important de les intégrer dans les modèles *in vitro* afin de préciser leur rôle en conditions physiologiques et pathologiques.

Les caractéristiques de la BHE font aussi d'elle un obstacle majeur à l'entrée d'un grand nombre de molécules thérapeutiques dans le parenchyme cérébral et donc empêche le traitement efficace de diverses pathologies du SNC. L'industrie pharmaceutique doit donc prendre la BHE en considération lors des différentes étapes du processus de découverte et de développement des médicaments, pour éviter les échecs liés à une faible pénétration cérébrale par exemple. En effet, une faible perméabilité de la BHE à un agent thérapeutique à visée cérébrale peut expliquer une faible pénétration cérébrale et donc une faible activité à son site cible. Afin de déterminer la perméabilité de la BHE aux nombreuses molécules générées lors des étapes précoces du processus de découverte des médicaments, l'industrie pharmaceutique a donc besoin de modèles *in vitro* faciles à cultiver mais reproduisant au mieux les caractéristiques de la BHE pour pouvoir être prédictifs (architecture cellulaire réaliste, voie paracellulaire restrictive, expression fonctionnelle de mécanismes de transport de la BHE). Aucun des modèles proposés jusqu'alors ne répond à tous ces critères à la fois, obligeant les acteurs industriels à utiliser plusieurs modèles selon l'investigation recherchée. Ces considérations soulignent la nécessité de simplifier les modèles *in vitro* de BHE afin qu'ils répondent à ces besoins.

Nous avons souhaité adapter notre modèle *in vitro* de BHE d'origine afin de répondre à ces différentes problématiques. D'une part, il a été complété par l'ajout des péricytes cérébraux - afin de modéliser plus finement la BHE ; d'autre part, sa mise en place a été simplifiée afin de l'adapter au criblage massif de molécules.

Deuxième partie

Travaux personnels

Mise en place et caractérisation de modèles *in vitro* de BHE intégrant les péricytes

LES ÉTUDES récemment menées *in vivo* chez des souris déficientes en péricytes démontrent que ces derniers sont indispensables à la mise en place de la BHE lors de l'embryogenèse (Dane-man *et al.*, 2010) et à son maintien à l'âge adulte (Armulik *et al.*, 2010; Bell *et al.*, 2010). De plus, les animaux présentant une perte progressive des péricytes cérébraux développent des défauts d'apprentissage et de mémorisation spatiale, des événements neurodégénératifs et neuroinflammatoires, précédés par un phénomène d'ouverture de la BHE (Bell *et al.*, 2010). Toutes ces données montrent l'importance des péricytes cérébraux dans le maintien des propriétés de la BHE et de l'homéostasie cérébrale, nécessaires au bon fonctionnement neuronal. Sur la base d'observations *in vitro* et *in vivo*, certains auteurs avaient déjà suggéré l'importance de leur rôle au sein de la BHE et avaient donc critiqué leur absence au sein des modèles *in vitro* la représentant (Lai et Kuo, 2005). Ce type cellulaire a en effet été longtemps négligé dans les études consacrées à la BHE, par conséquent les connaissances sur leurs fonctions à ce niveau sont aujourd'hui très parcellaires.

Alors que la majorité des modèles *in vitro* de BHE comprennent cellules endothéliales et astrocytes (ou cellules gliales), ajouter les péricytes au puzzle de la BHE paraît nécessaire à son étude. Cependant, la culture des péricytes cérébraux n'est pas chose facile, puisque ces cellules peuvent facilement se différencier en culture. De plus, lors du procédé d'extraction des capillaires cérébraux, des cellules musculaires lisses peuvent contaminer la culture de péricytes ; leur identification est délicate puisque ces deux types cellulaires partagent un grand nombre de marqueurs en commun. L'objectif de cette étude est double :

- d'une part, tenter de mieux caractériser les péricytes cérébraux en culture de façon à pouvoir les distinguer des CMLs vasculaires, en comparant leur phénotype ;
- d'autre part, mettre en place des modèles *in vitro* de BHE incluant des péricytes cérébraux, pour se rapprocher des conditions *in vivo* où les trois types cellulaires de la BHE sont réunis.

1.1 Résultats

L'étude comparée du phénotype des péricytes et des CMLs vasculaires a tout d'abord montré une grande similitude entre ces deux types cellulaires, puisque les marqueurs immunocytochimiques testés se sont avérés positifs dans les deux cas : dans nos conditions, péricytes et CMLs expriment l' α -actine de muscle lisse, le chondroïtine-sulfate protéoglycane NG2, le PDGFR- β ainsi que la vimentine (**Figure 1**). Malgré une différence morphologique entre elles, ces cellules devraient être scrupuleusement identifiées en culture.

Les péricytes ont été décrits comme la principale source de γ -GT au niveau des capillaires cérébraux (Risau *et al.*, 1992), et une étude récente a démontré l'expression de la P-gp par les péricytes cérébraux *in vitro* (Shimizu *et al.*, 2008). Nous avons souhaité confirmer ces observations dans nos culture de péricytes, et tester en parallèle l'expression de ces protéines au niveau des CMLs. Selon nos observations, péricytes et CMLs expriment différenciellement ces deux protéines (**Figure 2**). En effet, les péricytes présentent une activité γ -GT très supérieure à celle exhibée par les CMLs (**Figure 2a**). Quant à la P-gp, son expression est plus importante au niveau des péricytes, comme le révèle une étude en *western blot* (**Figures 2b**). De plus, en présence d'un inhibiteur de la P-gp (le vérapamil), l'accumulation d'un de ses substrats (la rhodamine 123) est plus élevée dans les péricytes que dans les CMLs. Nos résultats indiquent que, malgré une grande similitude entre les deux types cellulaires considérés, certains marqueurs y sont différenciellement exprimés et permettent donc de les distinguer en culture.

La poursuite de notre étude a consisté à **établir deux modèles *in vitro* de BHE alliant cellules endothéliales, péricytes cérébraux et cellules gliales, dans deux configurations différentes** (**Figure 3**). Les deux tricultures sont mises en place à partir de la coculture développée par Dehouck *et al.* (1990), et comprennent donc deux compartiments séparés par une membrane microporeuse permettant la diffusion de facteurs solubles (Figure 36).

Au sein de la première triculture les péricytes sont cultivés dans le compartiment inférieur en compagnie des cellules gliales, desquelles ils sont physiquement séparés par une couche de gel de collagène. Les cellules endothéliales sont quant à elles cultivées à la surface du filtre microporeux formant le compartiment supérieur. Du point de vue de la proximité entre cellules endothéliales et péricytes, ce modèle a été nommé la « **triculture sans contact** ».

Dans l'autre triculture, les péricytes sont en revanche cultivés à la surface du filtre recouvert de

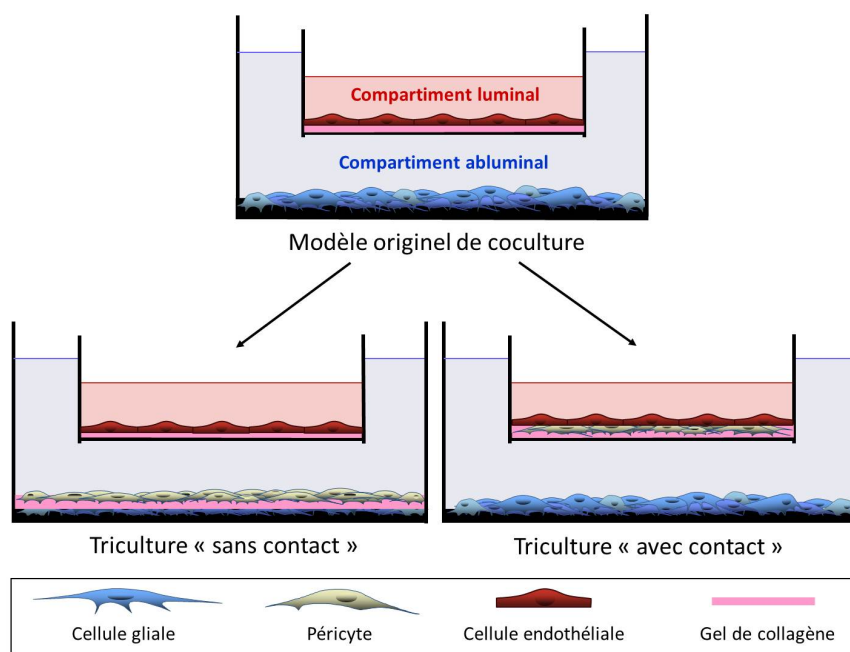


Figure 36 – Les deux modèles de triculture formés à partir du modèle de coculture de base développé par **Dehouck et al. (1990)**.

gel de collagène, directement sous la culture endothéliale. Les cellules gliales sont présentes dans le compartiment inférieur, donc à distance des deux premiers types cellulaires. Avec le même raisonnement que précédemment, ce modèle a été nommé « **triculture avec contact** ».

Ces modèles présentent-ils les caractéristiques de la BHE, comme le modèle sur lequel ils sont basés ? Si oui, l'ajout des péricytes à la culture apporte-t-il des caractéristiques nouvelles, ou modifie-t-il les propriétés existant au niveau des cellules endothéliales ? Les cellules endothéliales des deux modèles ont été caractérisées, notamment en terme de perméabilité paracellulaire, et d'expression des protéines des jonctions serrées et de transporteurs.

Le premier modèle (**triculture sans contact**) permet une caractérisation aisée des cellules endothéliales, puisqu'elles sont isolées des autres types cellulaires. L'immunomarquage des protéines des jonctions serrées a démontré la localisation corticale de l'occludine, de ZO-1 et de la claudine-5 (respectivement **Figures 4b, 4c et 4d**). La perméabilité paracellulaire de la monocouche endothéliale a été évaluée à l'aide du Jaune Lucifer, utilisé couramment comme marqueur d'intégrité de la BHE : dans la triculture sans contact, la perméabilité à cette molécule est faible et significativement inférieure à celle de la coculture classique (**Figures 4a**). L'expression transcriptionnelle de diffé-

rents transporteurs, dont la P-gp et différentes MRPs a aussi été déterminée en *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) : les résultats indiquent que les mêmes transporteurs sont exprimés au niveau des cellules endothéliales dans la coculture originale (**Figure 5a**) et dans la triculture sans contact. En effet dans les deux modèles sont retrouvées la P-gp et les MRPs 1, 4, 5 et 6, alors que ni l'ARN_m de MRP 2 ni de MRP 3 n'ont pu être amplifiés dans les deux cas. L'expression de la P-gp a été confirmée dans les deux modèles, au niveau protéique, grâce à une expérience complémentaire en *western blot* (**Figure 5b**). La fonctionnalité de cette pompe d'efflux a pu être confirmée grâce à une étude de l'accumulation de la rhodamine 123 en présence et en absence de vérapamil : en présence d'inhibiteur, la rhodamine 123 est accumulée de manière plus importante dans les cellules endothéliales qu'en absence de cet inhibiteur (**Figure supplémentaire 1**).

Dans la **triculture avec contact**, les cellules endothéliales présentaient une morphologie typique (en microscopie électronique, **Figure 6**) et une P-gp fonctionnelle (**Figure 7**). L'étude en microscopie corrélative (alliant microscopie optique, **Figures 6a** et **6b**, et électronique, **Figures 6c**, **6d** et **6e**) a démontré la très grande proximité entre cellules endothéliales et péricytes au sein de ce modèle, ainsi que la présence d'interdigitations entre eux. De plus, l'observation de l'espace intercellulaire entre péricytes et cellules endothéliales indique la sécrétion de matériel extracellulaire (**Figures 6d** et **6e**). L'observation des cellules endothéliales et des péricytes en microscopie confocale (respectivement immunomarqués pour le facteur de von Willebrand et l' α -actine de muscle lisse) montre que chaque péricyte peut contacter plusieurs cellules endothéliales, grâce aux nombreux prolongements qu'il émet (**Figures 6f** et **6g**). Dans ce modèle, la perméabilité paracellulaire endothéliale est similaire à celle obtenue en coculture classique, suggérant que la présence des péricytes sous la monocouche endothéliale n'empêche pas le maintien des jonctions serrées interendothéliales.

Modelling the Neurovascular Unit and the Blood-Brain Barrier with the Unique Function of Pericytes

Elodie Vandenhoute^{*,1,2,3}, Lucie Dehouck^{1,2,3}, Marie-Christine Boucau^{1,2,3}, Emmanuel Sevin^{1,2,3}, Rustem Uzbekov⁴, Meryem Tardivel⁵, Fabien Gosselet^{1,2,3}, Laurence Fenart^{1,2,3}, Roméo Cecchelli^{1,2,3} and Marie-Pierre Dehouck^{1,2,3}

¹Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

²Université d'Artois, LBHE, F-62300 Lens, France

³IMPRT-IFR114, F-59000 Lille, France

⁴Département des Microscopies, UFR de Médecine, Université François-Rabelais, 10 bd Tonnellé, 37032 Tours Cedex, France

⁵BICel-Campus Lille 2-IMPRT, Faculté de Médecine Pôle Recherche, 1 Place de Verdun, 59045 Lille cedex, France

Abstract: The blood-brain barrier (BBB) is a dynamic cellular complex that is responsible for the maintenance of brain homeostasis. To understand the BBB's key cellular and molecular mechanisms, *in vitro* models combining endothelial cells and astrocytes can be used to reproduce most of the barrier's *in vivo* features (low paracellular permeability and the expression of specific transporters). However, these models lack pericytes - a poorly characterized cell type which appears to be of crucial importance to understand BBB's function in healthy and diseased states. The present study sought to identify and characterize this cell population - which lacks a specific marker - by comparing its phenotype with that of vascular smooth muscle cells. Even if pericytes and smooth muscle cells shared many markers *in vitro*, our results showed that they could be distinguished by their different P-glycoprotein expression and γ -glutamyltranspeptidase activity. Two different three-cell-type culture models were described, including pericytes to mimic the neurovascular unit. In the first model, endothelial cells were cultured alone on a filter, away from glial cells and pericytes, allowing endothelial cell phenotype characterization. In the second model, glial cells were at the bottom of the well while pericytes and endothelial cells were cultured together in the filter: close interactions were observed in peg-and-socket contacts. In both models low paracellular permeability and P-glycoprotein functionality were demonstrated. These models are likely to be useful tools for understanding the pericytes' role in BBB physiology and could be of value in investigating the pericytes' influence on BBB in diseased states.

Keywords: Blood-brain barrier, endothelial cells, *in vitro* models, neurovascular unit, pericytes, three-cell-type model

INTRODUCTION

Brain capillary endothelial cells (ECs) form the anatomical basis of the blood-brain barrier (BBB) because of their unique characteristics; tight junctions, low pinocytotic activity and the expression of a large variety of specific transporters and efflux pumps. However, these features would not be fully functional in the absence of two other crucial cell types: the astrocytes (contacting the brain capillaries through numerous endfeet) and pericytes (embedded within the basement membrane that they share with ECs) [1]. Altogether, these components form the BBB - being part of what is now called the "neurovascular unit" (NVU) [2] - which is a complex, dynamic structure responsible for brain homeostasis maintenance; the key underlying cellular and molecular mechanisms are difficult to study *in vivo*. To investigate this highly complex biological system's features and behaviour more

easily, several BBB models have been developed (for a review, see [3]). To be of use, they have to meet a set of minimum requirements: low paracellular permeability, physiologically realistic cell architectures and the expression of the functional transport mechanisms found *in vivo* [4]. This task can only be achieved with capillaries from brain tissue. One of the major hurdles in obtaining pure primary cultures of brain capillary ECs with conventional digestion techniques is the presence of contaminating, growth-inhibiting pericytes [5]. Pericytes do not prevent ECs from expressing the BBB phenotype *in vitro* but easily invade EC subcultures. Very few methods (involving mechanical homogenisation, filtration and cloning techniques) enable the culture of pure capillary EC cultures [6]. All the currently validated models comprise primary or subcultured brain ECs in co-culture with astrocytes. The models exhibit most of the BBB's *in vivo* features [7] and are useful for studying the mechanistic aspects of transport across ECs and the latter's interactions with astrocytes. Even if these *in vitro* models present a strong correlation with the BBB's *in vivo* permeability, they are not suitable for NVU study because they lack pericytes, which seem to be of crucial importance in BBB physiology [8].

*Address correspondence to this author at the Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique, Faculté des Sciences Jean Perrin, rue Jean Souvraz, SP 18, 62307 Lens cedex, France; Tel: +33-321791741; Fax: +33-321791736; E-mail: elodie.vandenhoute@wanadoo.fr

Pericytes were identified 140 years ago but have yet to be fully characterized. Although pericytes are present in all the capillary beds in the body, the fact that these cells are much more numerous in the retina and the brain [9] suggests an important role in barrier function. Some authors have suggested that pericyte dysfunction may underlie several central nervous system pathologies, such as Alzheimer's disease [10]. A recent study by Bell *et al.* [11] demonstrated that the absence of pericytes in platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFR- β)-deficient mice resulted in progressive, age-dependent, vascular-mediated neurodegeneration. Pericytes have been shown to constrict capillaries soon after transient cerebral ischaemia followed by reperfusion [12]. Taken as a whole, these data suggest that pericyte dysfunction could be involved in the course of several cerebrovascular diseases. Hence, better knowledge of brain pericyte physiology should help us to understand the BBB's function in healthy and diseased states.

In the present study, we first sought to better characterize cultured pericytes by comparing their *in vitro* phenotype with that of vascular smooth muscle cells (SMCs). In particular, we investigated gamma-glutamyltranspeptidase (γ -GT) activity and P-glycoprotein (P-gp) expression in the two cell types. Secondly, pericytes, ECs and glial cells were integrated into three-cell-type BBB models based on the co-culture model developed in our lab, which originally combined ECs and glial cells in a two-chamber system [13]. Two different configurations were implemented. In the first configuration, pericytes were cultured with glial cells at the bottom of the wells, which enables the endothelial phenotype to be studied more easily. Pericytes were cultured with ECs in the second configuration, which therefore takes account of direct EC-pericyte interactions. The new *in vitro* BBB models characterized in the present article could be useful for determining the pericytes' role within the BBB in healthy and diseased states.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Cells were cultivated in incubators at 37°C, in a humidified atmosphere with 5% CO₂/95% air. Before incorporation in culture media, all sera were heat-inactivated.

Culture of Pericytes and Vascular Smooth-Muscle Cells (SMCs)

Pericytes were extracted from freshly collected bovine brain capillaries. Briefly, brain capillaries were collected on a 60- μ m nylon sieve, washed in phosphate buffered saline (PBS), and resuspended in a 60-mm Petri dish containing pericyte culture medium: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Life Technology, Carlsbad, California, USA) supplemented with 20% (v/v) fetal calf serum (FCS, Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA), 2 mM L-glutamine (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany), 50 μ g/mL gentamicin (Biochrom AG, Berlin, Germany) and bFGF (basic fibroblast growth factor, 1 ng/mL, added every other day; Recombinant Human bFGF, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). This microvascular suspension which mainly comprised capillaries was dispatched into 12 Matrigel-coated dishes containing pericyte culture medium.

On the following day, Petri dishes were carefully screened for large vessels. Each large vessel was scrapped and discarded. Pericytes and ECs migrated from the vessel walls. Pericytes rapidly overgrew the few ECs out from capillaries, and invaded the whole surface of the dish. Confluent cultures, consisting almost exclusively of pericytes, were dissociated with trypsin/EDTA saline solution (0.05%/0.02%, Biochrom AG), and cells were frozen in liquid nitrogen. For experiments, each pericyte vial was rapidly thawed and seeded in gelatine-coated 60-mm Petri dishes containing pericyte culture medium. After defrosting, there were no ECs left in cultures. Pericytes were subcultured at a split ratio 1/3, and were used at passages ≤ 3 . For the setting up of three-cell-type models, pericytes were used one week after thawing of the vial.

SMCs were extracted from freshly collected bovine aorta. The vessel was opened longitudinally, rinsed free of blood and scrapped to remove ECs. Pieces of the vessel wall were dissected and were put into Petri-dishes containing DMEM supplemented with 15% (v/v) calf serum (CS, Gibco, Auckland, New Zealand), 2 mM L-glutamine, 50 μ g/mL gentamicin, 2.5 μ g/mL fungizone and bFGF. SMCs rapidly migrated from the vessel wall onto the dish and grew. Cultures of uniform morphology consistent with vascular smooth muscle cells and positive for alpha-smooth muscle actin were frozen in liquid nitrogen.

Both cell types were cultured in pericyte culture medium.

BBB Co-Culture Model: Glial Cells/ECs

The method from Dehouck *et al.* [13] was used.

Briefly, glial cells were isolated from newborn Sprague-Dawley rats (Centre d'Élevage Roger Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France), plated on uncoated 6-well dishes (Costar, Corning Incorporated, NY, USA) and cultured during 3 weeks in DMEM supplemented with 10% (v/v) FCS, 2 mM L-glutamine and 50 μ g/mL gentamicin. Glial cell cultures are ready three weeks after seeding, and comprise a mix of astrocytes, oligodendrocytes and microglial cells. From this stage, they can be used to set up co-cultures with ECs.

Bovine brain capillary ECs were isolated as previously described [13], and seeded onto rat tail collagen gel-coated inserts (CM Inserts, diameter 30 mm, 0.4 μ m pore size, Millicell-CM, Millipore Corporation, Molsheim, France) which were adapted in the wells containing glial cells. The rat tail collagen gel was prepared as already described [13], and each filter was coated with 150 μ L of rat tail collagen gel prior to EC seeding. Brain capillary ECs were seeded on the upper side of the filters, at a concentration of 4×10^5 cells/mL. Experiments were initiated after 12 days of co-culture between the two cell populations for ECs to acquire a proper BBB phenotype.

The culture medium used for the co-culture model corresponds to DMEM supplemented with 10% (v/v) horse serum (Gibco), 10% (v/v) CS, 2 mM L-glutamine, 50 μ g/mL gentamicin and 1 ng/mL bFGF (added every other day).

BBB Three-Cell-Type Models: Glial Cells + pericytes + ECs

On the basis of the original co-culture model, two different three-cell-type models were designed (Fig. 3): in

the first one, pericytes were cultured at the bottom of the well together with glial cells, while ECs were seeded in the filter. Because ECs and pericytes are not cultured in the same compartment, this model was called "non-contact model". In the second model pericytes were cultured in the filter with ECs, while glial cells were seeded at the bottom of the well. Because of the proximity between ECs and pericytes, this model was called "contact model".

The culture medium for both three-cell-type models was the same as for the co-culture model. Experiments were also carried out after 12 days of culture.

Non-Contact Model: (Glial Cells + Pericytes)/ECs

Three-week-old glial cell cultures were coated with rat tail collagen gel before seeding pericytes. In this purpose, 300 μ L of freshly prepared rat tail collagen gel were dispatched on each well of glial cells. The coating was dried for 1 hour in a humidified incubator with 5% CO₂/95% air at 37°C. After that, the coating was rinsed three times (3 x 10 min) with pericyte culture medium without bFGF. At the end, each well was filled with 2 mL of complete pericyte culture medium. Then pericytes were trypsinised and seeded in the above-mentioned wells containing glial cells coated with collagen (35,000 pericytes seeded per well of 9.5 cm²). The cells adhered to the substrate at least for three hours before any further manipulation. ECs were seeded at a concentration of 4×10^5 cells/mL in 6-well-plate filters (CM inserts) which were adapted in the wells containing pericytes and glial cells.

As a control for this non-contact model, the corresponding co-culture model was set up with a collagen gel layer on the glial culture.

Contact Model: Glial Cells/(Pericytes + ECs)

Pericytes were seeded onto rat tail collagen gel-coated inserts (CM), which had been adapted in the wells containing 3-week-old glial cells (1,000 pericytes per filter of 4.2 cm²). After at least three hours, ECs were seeded at a concentration of 4×10^5 cells/mL in the inserts.

CHARACTERIZATION OF CELLS AND MODELS

γ -Glutamyl Transpeptidase (γ -GT) Study

Cell Culture and Sample Preparation

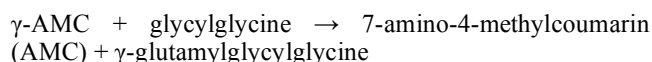
Pericytes and SMCs were grown on gelatine-coated plastic Petri dishes (diam. 60 mm). The medium was changed twice a week. After a 7-day culture period, cells from each Petri dish were scraped in 600 μ L of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4), and sonified in three 1-sec bursts at 45W peak power (Ultrasonic processor, Bioblock Scientific, Illkirch, France).

Protein concentration in each sample was determined by the method of Bradford (Bio-rad Protein Assay, Biorad, Hercules, CA, USA), according to manufacturer's instructions.

Fluorometric Assay for γ -GT Activity Assessment

The enzymatic assay was conducted according to the protocol described by Shine and Haber [14]. The substrate was the 7- γ -glutamylamido-4-methylcoumarin (γ -AMC)

(Sigma-Aldrich). The incubation mixture was 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) with 300 μ M γ -AMC, 20 mM glycylglycine (Sigma-Aldrich) and 1% (v/v) dimethylsulfoxide. The enzymatic reaction was started by adding the cell homogenate at 37°C under agitation, and was stopped by adding 20% (v/v) acetic acid. The reaction was:



The reaction product – AMC – is highly fluorescent. To follow its production along the reaction course, the excitation and emission wavelengths were 355 and 460 nm respectively (Fluoroscan Ascent fluorometer, Thermo Labsystems, Issy-Les-Moulineaux, France). The amount of AMC produced was determined from a standard curve, and enzymatic activity expressed as μ M of AMC released/min/mg of protein.

Microscopy

Immunofluorescence Studies

Antibodies and reagents used for immunofluorescence studies are listed in Supplementary Table 1.

- On Pericyte and SMC Cultures

The cultures of pericytes and smooth muscle cells were double-immunostained for alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and neuron-glial 2 (NG2) - two markers used to identify pericytes in culture - and immunostained for PDGFR- β and vimentin. The procedure was the following: cells were washed with PBS-CMF solution (phosphate buffered saline - calcium and magnesium free; 8.0 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L, KH₂PO₄ et 2.87 g/L Na₂HPO₄-12H₂O), pH 7.4) once, fixed 1 min in cold methanol/acetone (v/v) and washed three times with PBS-CMF. Following 30-min incubation in PBS-CMF supplemented with 10% (v/v) normal goat serum (NGS), cells were incubated 1H with the primary antibody at room temperature (RT). After 3 washes in PBS-CMF supplemented with 2% NGS, preparations were incubated with the secondary antibody for 30 min at RT. Nuclei were stained using Hoechst reagent. Cells were mounted using Mowiol (Sigma-Aldrich) containing 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (Sigma-Aldrich) as an anti-quenching agent.

For the dual immunostaining, preparations were consecutively incubated with the first primary antibody and then with the second one (1H each, with three washes in PBS-CMF supplemented with 2% NGS between the two incubations), the same procedure was followed concerning the secondary antibodies.

Cells were observed with a Leica DMRD fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Images were collected using a Cool SNAP RS Photometrics camera (Leica Microsystems) and processed with Adobe Photoshop software 5.5 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

- On Endothelial Monolayers

Immunofluorescence experiments were performed on fixed ECs. Fixation with 4% paraformaldehyde in PBS-CMF (10 min at RT) was used for occludin and zonula occludens-1 (ZO-1) immunostainings, and permeabilisation was performed by using Triton X-100 (0.1% (w/v) in PBS-CMF) 10

min at RT. The same protocol was used for P-gp immunostaining, but permeabilisation with Triton X-100 lasted 2 min instead of 10 in this case. To immunostain Claudin-5, cells were fixed and permeabilised 1 min with cold methanol/acetone (v/v). For the von Willebrand factor (vWF)/ α -SMA dual immunostaining in the contact model, cells were fixed and permeabilised 4 min with cold methanol/acetone (v/v).

Following fixation and permeabilisation steps, the rest of the protocol was the same as for pericytes.

The scan of P-gp immunostaining in the contact model was performed with an LSM 710 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a DPSS laser, with excitation at 561 nm and emission between 568 and 712 nm for Alexa Fluor 568. A UV laser was used for Hoechst 33258, with excitation at 405 nm and detection at 425-494 nm. Three-dimensional analysis was performed by Z-axis imaging with 0.16 μ m-thick optical slices. Acquisitions were performed in sequential mode and analysed with Zeiss Efficient Navigation confocal software (Carl Zeiss).

Dual vWF/ α -SMA immunostaining in the contact model was also observed with the Zeiss LSM 710 confocal microscope under the same conditions, along with an additional scan for Alexa Fluor 468 (excitation at 488 nm with the argon laser and emission between 493 and 563 nm).

Correlative Microscopy Studies on the Contact Three-Cell-Type Model

The inserts were rinsed twice with Ringer-HEPES solution (RH solution; 150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl_2 , 0.2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6 mM NaHCO_3 , 5 mM HEPES, 2.8 mM glucose, pH 7.4), fixed with 2.5% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), and postfixed in 1% osmium tetroxide. After dehydration in graded ethanol, samples were embedded in Epon 812. First, semi-thin sections of these samples were cut and stained with toluidine blue. Ultrathin sections of the same samples were cut on Ultracut UCT (Leica), contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Jeol 1011 TEM at an accelerating voltage of 100 Kv.

Expression of Transporters

RNA Extraction and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RNA extractions from ECs, pericytes and SMCs, and the corresponding RT-PCR were conducted as already described [15]. All parameters and primer sequences are presented in Supplementary Table 2.

Western Blotting

- On Pericytes and SMCs

Cells were washed twice with PBS-CMF at 37°C and were put in lysis buffer (RIPA lysis buffer, Millipore Corporation) supplemented with phosphatase and protease inhibitor cocktails (Sigma-Aldrich). Protein concentration in each sample was determined by the method of Bradford. Then, 30 μ g of proteins were electrophoresed on 7.5% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel (Bio-Rad) and subsequently electrotransferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Saclay, France). Membranes were treated 90 min with blocking buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500

mM NaCl, 0.1% Tween 20, 5% skimmed milk) at RT, and incubated overnight at 4°C with the primary antibody: mouse monoclonal anti-P-gp antibody C219 (1/200, Abcam, Cambridge, UK) or rabbit anti- β -tubulin antibody (1/1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). The membranes were washed three times with blocking buffer and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibody. Immunoreactivity was visualized with an enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare) and exposed with Hyperfilm ECL™ (GE Healthcare).

- On ECs

ECs from the non-contact model were rinsed twice with PBS-CaMg (PBS-CMF supplemented with 0.1 g/L CaCl_2 and 0.1 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) at 37°C and then incubated with 1 mg/mL collagenase (Sigma-Aldrich, 1 mg/mL in PBS-CaMg) for 5 min. The enzymatic activity was stopped by transferring the resulting cell suspension in co-culture medium at 37°C. After a first centrifugation step (8 min, 800 rpm at 4°C), the supernatant was discarded and the cells resuspended in PBS-CMF and centrifuged again. After discarding the whole supernatant, the cell pellets were put in lysis buffer. The rest of the protocol was the same as described for pericytes.

Drug Accumulation and Transport Studies

Rhodamine 123 (R123) Accumulation

- In Pericytes and SMCs

Drug accumulation assays were performed to test the functional activity of P-gp in pericytes and SMCs. Pericytes and SMCs were seeded on gelatin-coated 6-well plates at a density of 50,000 cells/well and 20,000 cells/well respectively. All assays were performed on a temperature-controlled shaker at 37°C. All cell cultures were washed with RH solution (37°C), and then incubated 2H with rhodamine 123 (R123, Sigma-Aldrich, 20 μ M in RH solution), with or without verapamil (Sigma-Aldrich, 25 μ M in RH solution). The reaction was stopped by putting the plates on ice and rinsing them five times with ice cold RH solution. The cells were lysed with 0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS-CMF solution at RT. Fluorescence detection in samples was carried out on a Fluoroscanner Ascent fluorometer (excitation at 485 nm and emission at 538 nm).

- In ECs and Pericytes (From the Contact Model)

The filters were rinsed with pre-warmed RH solution. Then they were incubated in the luminal compartment with R123, with or without verapamil for 2H, while the abluminal compartment was filled with RH solution. The rest of the protocol was the same as for pericytes.

Trans-Endothelial Transport Studies

The method described in Dehouck *et al.* [16] was used.

Statistical Analysis

All results were expressed as means \pm SEM from three or more independent experiments. Statistical significance was assessed by unpaired t-tests. A p-value < 0.05 was considered as significant. All statistical analyses were performed

using GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

N.S.: not significant, * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$

RESULTS

Pericyte Identification and Characterization *in vitro*

Cultured brain pericytes were characterized by comparing their immunocytochemical features with those of phenotypically related vascular SMCs. *in vitro* pericytes and SMCs looked alike, but pericytes showed numerous tiny pro-

jections and SMCs were thinner and more elongated (Fig. 1a).

However, their clear identification can only be achieved thanks to immunocytochemical characterization. The fact that pericytes and SMCs express many of the same cell markers complicates their identification *in vitro*. In cell culture, both pericytes and vascular SMCs immunostained positive for platelet derived growth factor-beta (PDGFR- β), alpha-smooth muscle actin (α -SMA), neuron-gial 2 (NG2) and vimentin (Fig. 1b, 1c, 1d and 1e respectively). Hence, these criteria cannot be used to unambiguously identify pericytes

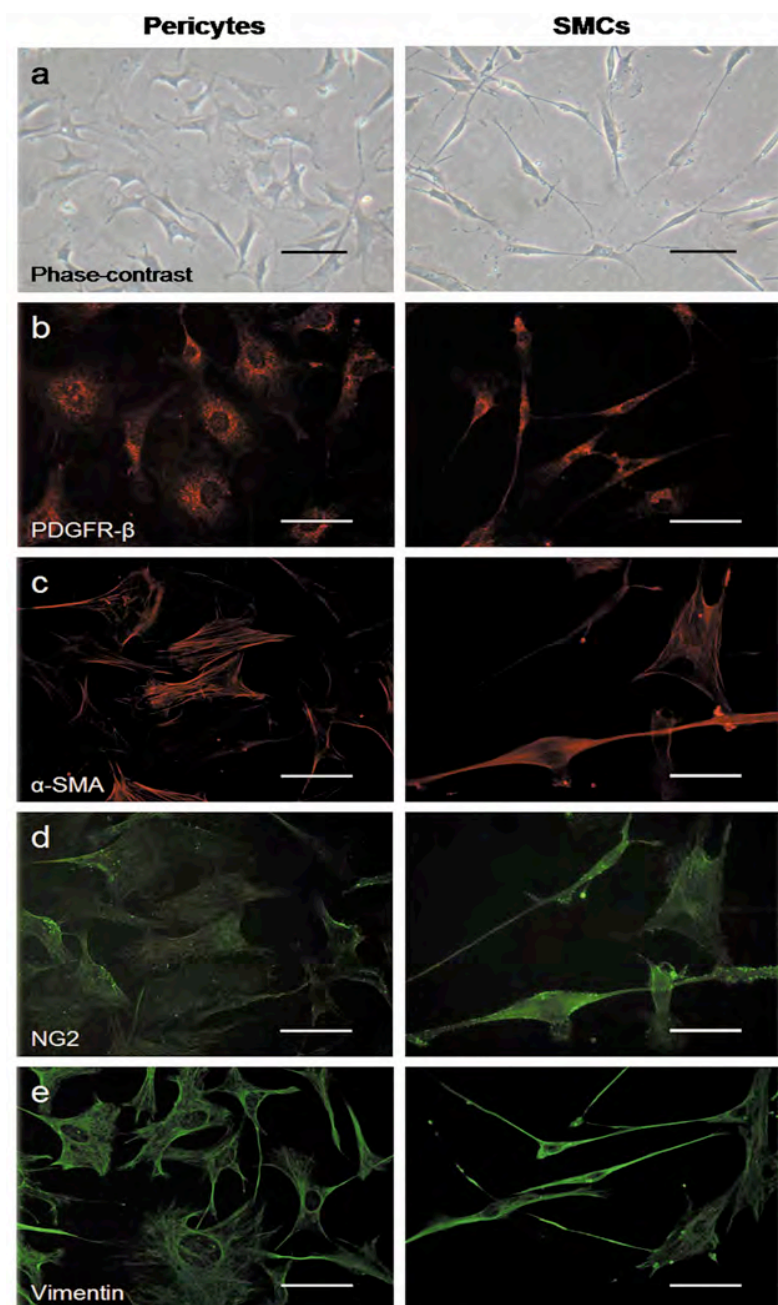


Fig. (1). Immunocytochemical characterization of pericyte and smooth muscle cell (SMC) cultures *in vitro*. Phase contrast micrographs (a) and immunostaining of pericyte cultures (left panel) and SMC cultures (right panel) for platelet-derived growth factor-beta (PDGFR- β , b), alpha-smooth muscle actin (α -SMA, c), neuron-gial 2 (NG2, d) and vimentin (e).

(a): scale bar = 100 μ m; (b), (c), (d) and (e): scale bar = 50 μ m

in vitro, since the latter cultures can be contaminated by vascular SMCs. Furthermore, pericytes can transdifferentiate into SMCs [17].

Risau *et al.* [18] showed that brain pericytes expressed high levels of γ -GT activity. Other researchers have detected P-gp - a major BBB efflux pump - in pericytes [19]. We therefore compared the expression of these two proteins in pericytes and SMCs. Pericyte cultures exhibited thirteen times more γ -GT activity than SMCs (15.59 ± 0.88 and 1.20 ± 0.03 μ M AMC/min/mg of protein, respectively, Fig. 2a). They also expressed higher levels of P-gp than SMCs, as assessed by RT-PCR (Fig. 2b) and Western blot analysis (Fig. 2c). This latter result was confirmed by investigating the cellular accumulation of the P-gp substrate rhodamine

123 (R123) in the presence and absence of the P-gp inhibitor verapamil. In the presence of verapamil, pericytes accumulated more than four times as much R123 as in the absence of the inhibitor. Under the same conditions, SMCs accumulated barely twice as much R123 (Fig. 2d).

These results show that conventional *in vitro* markers (such as α -SMA and/or NG2 chondroitin sulphate proteoglycan expression) are not sufficient for distinguishing between pericytes and SMCs. In contrast, P-gp and γ -GT expression can be used to identify pericytes *in vitro*.

Because pericytes are being recognized as critical components of the BBB [20], integrating them into BBB models seems appropriate, as already proposed by Lai and Kuo [8]. To this end, three-cell-type models were created by adding

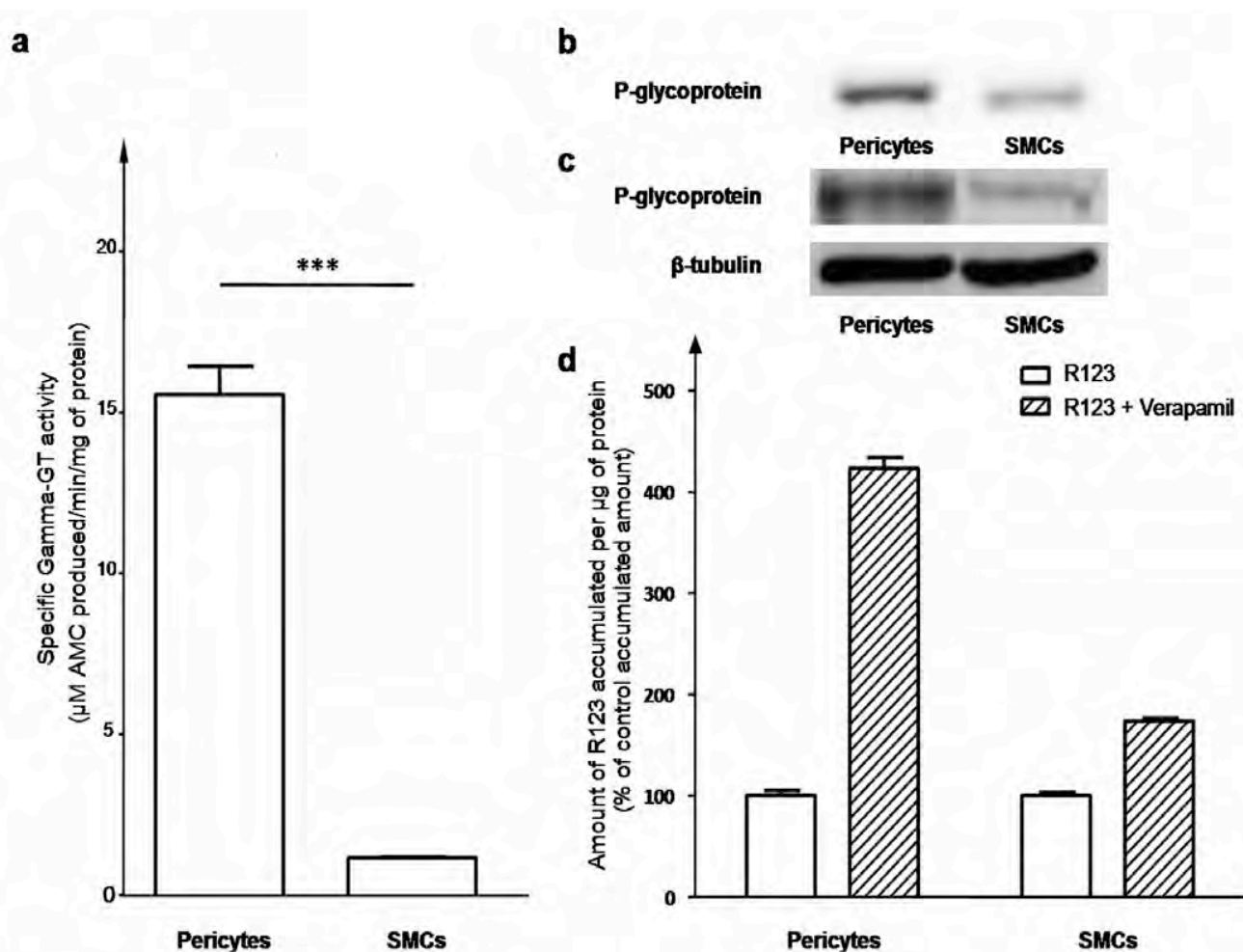


Fig. (2). Study of specific gamma-glutamyltranspeptidase (γ -GT) activity (a) and of P-glycoprotein (P-gp) expression (b and c) and function (d) in pericyte and smooth muscle cell (SMC) cultures.

(a) Gamma-GT activity was assessed in a fluorometric assay of three different extracts from pericyte and SMC cultures. For statistical purposes, an unpaired t-test was performed (***) with $n = 3$.

(b) and (c) P-gp expression was assessed by RT-PCR (b) and Western blots (c) in pericyte and SMC cultures. β -tubulin was used as a loading control for Western blots (c).

(d) P-gp function was assessed *via* the accumulation of substrate (rhodamine 123, R123) in the presence and absence of the inhibitor verapamil in pericyte and SMC cultures ($n = 3$). For each cell type, the baseline amount of accumulated R123 (i.e. in the absence of verapamil) was taken as 100%; pericytes accumulated 1.32 ± 0.06 arbitrary units of R123/ μ g of protein, whereas SMCs accumulated 3.12 ± 0.10 arbitrary units of R123/ μ g of protein.

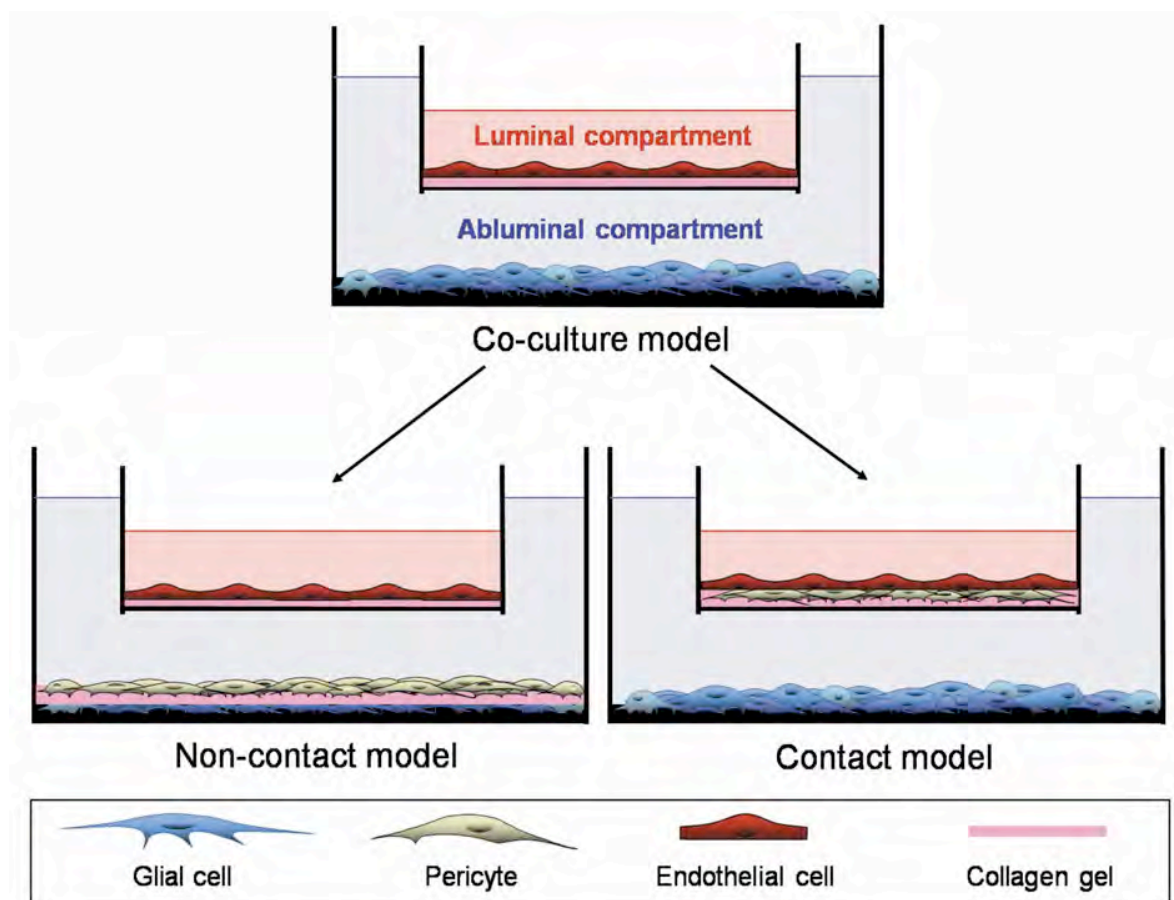


Fig. (3). Design of the two three-cell-type models, on the basis of the original co-culture model.

In the non-contact model, pericytes were added to the original co-culture by coating the glial cell culture with a collagen gel and seeding them on this matrix (**left panel**). In the contact model, pericytes were integrated into the collagen-coated filter membrane under the endothelial monolayer (**right panel**).

brain pericytes to the original co-culture model [13] comprising ECs and glial cells in a two-chamber system (Fig. 3). Two models were designed; in the first one, pericytes were added to the abluminal compartment with the glial cells (referred to hereafter as the "non-contact model"; Fig. 3, **left panel**). In the second, pericytes were added to the luminal compartment with the ECs (referred to hereafter as the "contact model"; Fig. 3, **right panel**).

Characterization of the Non-Contact Model: (Glial Cells + Pericytes)/ECs

This model facilitates analysis of (i) the ECs themselves and (ii) the crosstalk between the three cell types mediated by soluble factors (Fig. 3, **left panel**). Comparison of the EC phenotype in the non-contact model and the corresponding co-culture model enabled us to assess the pericytes' contribution to the BBB phenotype.

BBB integrity was investigated by studying the transport of Lucifer Yellow (LY, a small, hydrophilic molecule commonly used to assess paracellular permeability) across the endothelial monolayer. The endothelial monolayer in the non-contact model was even less permeable to LY ($0.30 \pm$

0.01×10^{-3} cm/min, Fig. 4a) than the co-culture model ($0.39 \pm 0.03 \times 10^{-3}$ cm/min) (Fig. 4a). This result correlates with the fact that the non-overlapping ECs formed a homogeneous monolayer after 12 days of culture in the non-contact model (Fig. 4b, c and d). The endothelium showed normal expression and localization of the tight-junction proteins occludin (Fig. 4b), *zonula occludens*-1 (ZO-1, Fig. 4c) and claudin-5 (Fig. 4d).

RT-PCRs revealed that the ECs in the non-contact model expressed a broad range of efflux pumps (multidrug resistance proteins (MRP) 1, 4, 5 and 6 and P-gp) that are also present in the co-culture model (Fig. 5a) [15]. However, MRP2, MRP3 and MRP7 were not amplified in the ECs in the co-culture model and the non-contact model. P-gp expression in ECs was confirmed by Western blots (Fig 5b) and immunocytochemical assays (Supplementary Fig 1a). P-gp function was evidenced by the accumulation of R123 in the absence and presence of verapamil (Supplementary Fig 1b); as in the co-culture model, more R123 accumulated in the presence of verapamil than in the baseline condition (10 times and 13 times as much for endothelial cells in the co-culture model and the non-contact model, respectively).

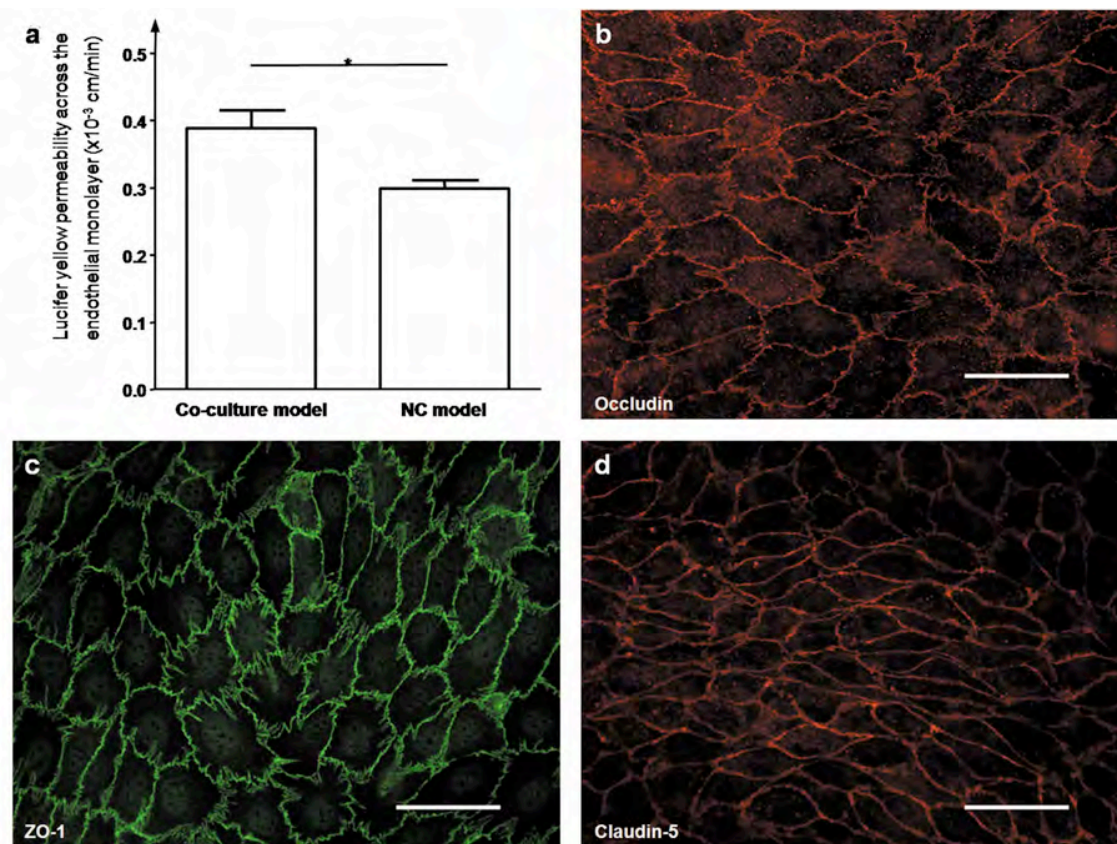


Fig. (4). Lucifer Yellow (LY) permeability across the endothelial monolayer from the non-contact model, in comparison with the corresponding co-culture model (a) and immunostaining of the endothelial monolayer from the non-contact model for the tight-junction proteins occludin (b), *zonula occludens-1* (ZO-1, c) and claudin-5 (d).

(a) Results represent the mean \pm SEM of 8 experiments. Endothelial permeability was determined as described in the "Materials and Methods" section. For statistical purposes, an unpaired t-test was performed (* $p < 0.05$ versus control co-culture model) with $n = 8$; (b), (c) and (d): scale bar = 50 μ m

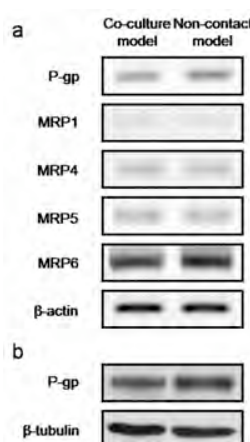


Fig. (5). Efflux pump expression in endothelial monolayers from the co-culture model (left panel) and the non-contact model (right panel).

(a) Study of multidrug resistance protein (MRP) and P-glycoprotein (P-gp) expression by RT-PCRs; β -actin expression was considered as a loading control.

(b) Study of P-gp expression by Western blots; β -tubulin expression was considered as a loading control.

We did not observe any differences in transporter expression between ECs from the co-culture model and those in the non-contact model; this finding suggests that pericytes have little influence on the BBB phenotype of ECs concerning efflux pump expression in physiological conditions.

Characterization of the Contact Model: Glial Cells/ (Pericytes + ECs)

In order to allow both direct cell-cell contacts between pericytes and ECs and possible crosstalk with glial cells *via* soluble factors, in this model pericytes and ECs were cultured together in the insert (Fig. 3, right panel). The contact model includes pericytes in the vascular compartment, since pericytes and ECs are known to share the same basement membrane within the capillary wall. The endothelial monolayer from the contact model exhibited much the same low permeability to LY ($0.52 \pm 0.06 \times 10^{-3}$ cm/min, $n = 3$) as a monolayer in the corresponding co-culture model ($0.41 \pm 0.05 \times 10^{-3}$ cm/min, $n = 3$), as well as proper expression of tight junction protein ZO-1 (data not shown).

Filters from the contact model underwent inclusion and toluidine blue staining for correlative microscopy analysis. Observation of semi-thin sections revealed a thin, homogeneous monolayer of ECs on the underlying pericytes (Fig. 6a

and **6b**). Most pericytes were separated from the ECs by a 50-100 nm gap as assessed by transmission electron microscopy (Fig. **6c**), and interposition of basement membrane material could be observed (Fig. **6d** and **6e**, **stars**). The two cell types' plasma membranes were in close proximity (especially at the site of intimate, intercellular pericyte/endothelium interdigitations; Fig. **6d** and **6e**) but were not generally in direct physical contact. Slight, focal densification of the plasma membranes at these contact points (Figs. **6d** and **6e**,

arrows) suggested the initiation of differentiation. Confocal microscopy analysis of the same culture showed that the large surface area covered by a single pericyte (immunostained for α -SMA) enabled it to contact many different ECs (immunostained for von Willebrand factor) (Fig. **6f** and **6g**). Moreover, the pericytes showed a large number of tiny projections (Fig. **6f**).

P-gp expression by ECs in the contact model was checked by immunostaining and confocal microscopy (Fig. **7a**).

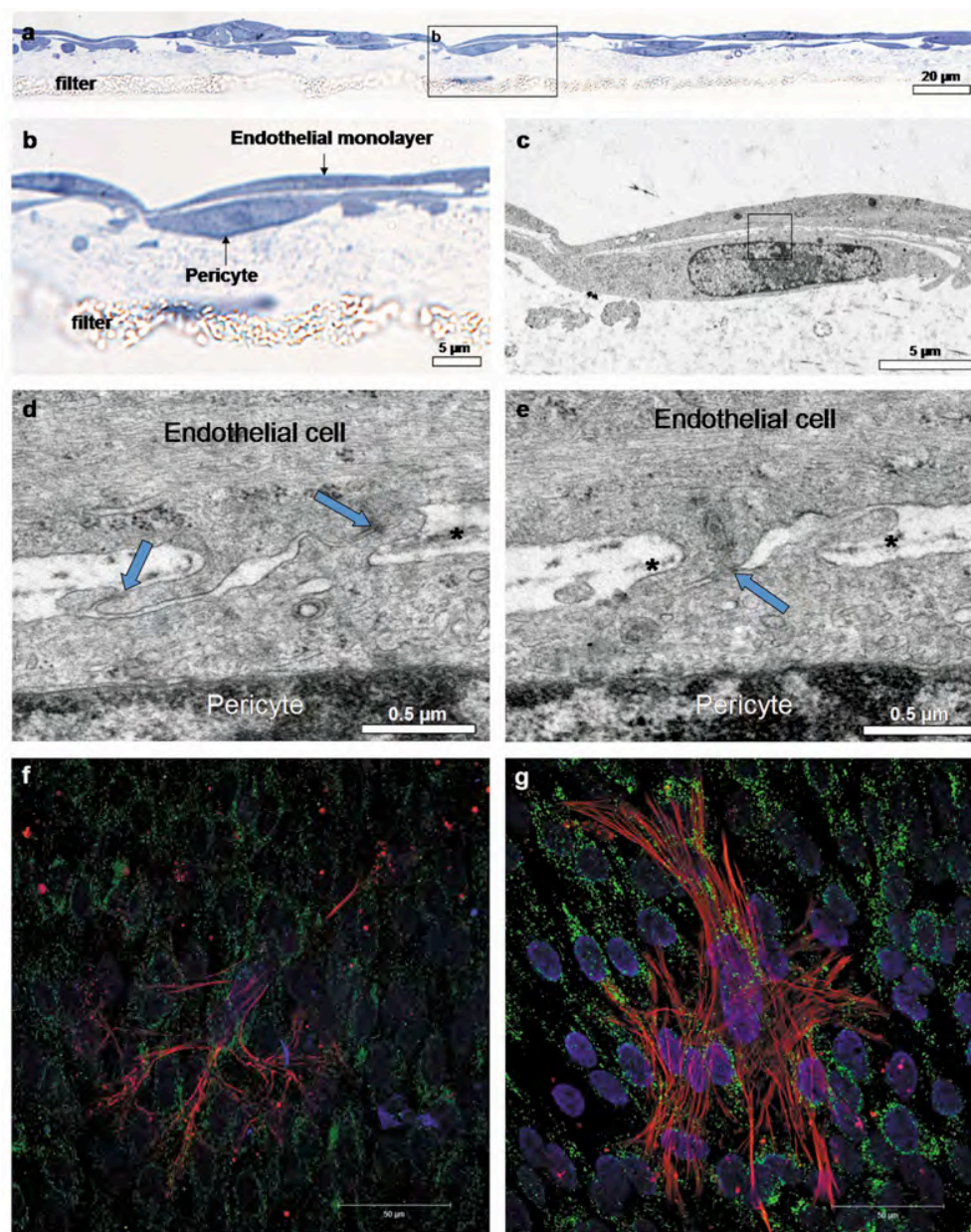


Fig. (6). Study of endothelial cell (EC) and pericyte organisation in the contact model using correlative microscopy (**a**, **b**, **c**, **d** and **e**) and confocal microscopy (**f** and **g**).

Toluidine blue-stained semithin sections reveal a homogeneous EC monolayer (**a**, and magnification of a zone, **b**) on underlying pericytes. The same zone was examined on ultrathin sections by transmission electron microscopy (**c**) and revealed close proximity between the two cell types. Higher magnification revealed interdigitations between ECs and pericytes (**d** and **e**), with a slight densification of the plasma membrane (**arrows**) and interposition of basement membrane material (**stars**); (**f** and **g**) Maximum-intensity projection through a triple channel optical section series of ECs immunostained for von Willebrand factor (green) and pericytes immunostained for alpha-smooth muscle actin (red) in the contact model, together with Hoechst staining (in blue).

The expressed P-gp was functional, as shown by the accumulation of 8 times more R123 in the presence of verapamil than in the absence of the inhibitor (Fig. 7b).

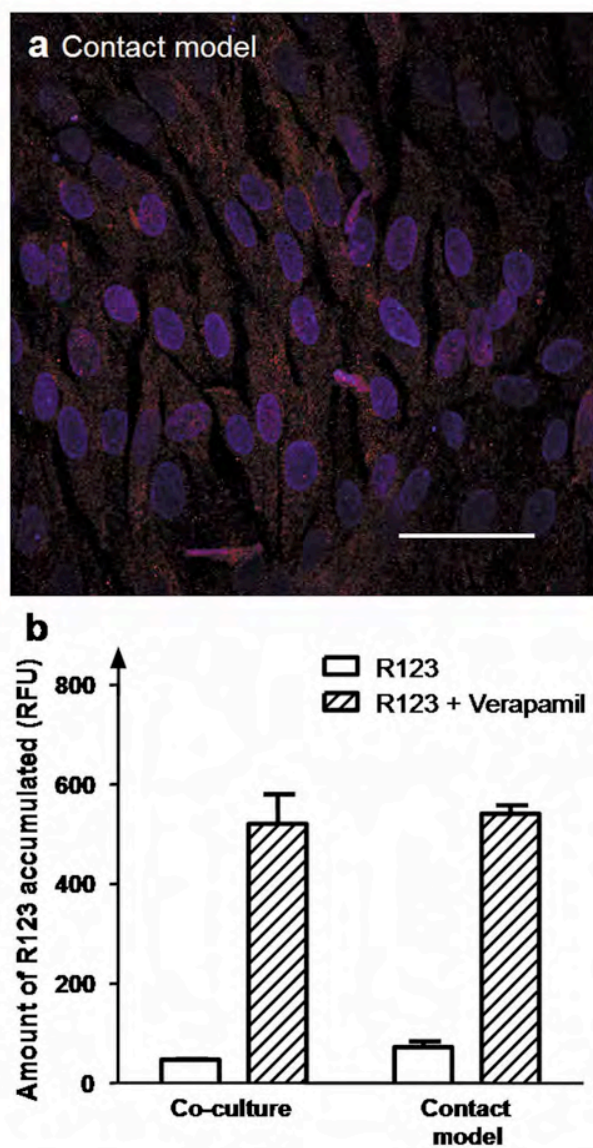


Fig. (7). Study of P-glycoprotein (P-gp) expression (a) and function (b) in the contact model.

(a) A maximum-intensity projection through a triple-channel optical section series of ECs from the contact model immunostained for P-gp (red), together with Hoechst staining (in blue). Scale bar = 50 μ m

(b) P-gp function was assessed *via* the accumulation of substrate (rhodamine 123, R123) in the presence and absence of the inhibitor verapamil in ECs from the contact model ($n = 3$).

The presence of both ECs and pericytes in the same compartment prevented us from studying EC-specific expression of transporters and proteins by RT-PCR or Western blots (as is also the case for isolated capillaries *ex vivo*).

The presence of pericytes under the endothelial cell culture in the same compartment did not prevent the formation of a regular monolayer exhibiting BBB features (low per-

meability for nonpermeant molecules, tight junction protein and transporter expression), while allowing close contacts between the two cell types.

DISCUSSION

Characterization of Pericytes and SMCs *in vitro*

Alpha-SMA and NG2 chondroitin sulphate proteoglycan are commonly used as markers for pericytes *in vitro* [19,21]. Under our culture conditions, pericytes and SMCs were positive for not only α -SMA and NG2 but also PDGFR- β and vimentin. These data emphasize the need to use multiple markers for the unambiguous identification of pericytes *in vitro*, since single, pericyte-specific markers have not yet been identified. Indeed, using single markers can lead to misinterpretations, as already noted by Armulik *et al.* [22]. Moreover, pericytes are able to transdifferentiate into various types of mesenchymal cells; they can differentiate into vascular SMCs (and *vice versa*) [17] but can also give rise to fibroblasts, osteoblasts, chondrocytes and adipocytes [23]. Pericytes dedifferentiate in culture and can also transform into multinucleated giant cells or form large calcifying nodules, demonstrating that they could participate in vascular calcification [24]. BBB pericytes are considered to be pluripotent cells [25]. As a consequence, misinterpretations may arise if insufficient care is paid to pericyte identity and fate under *in vitro* conditions. For these reasons, it is preferable not to use pericytes after their third passage. However, the previously cited immunocytochemical markers can be helpful in *in vivo* and *ex vivo* studies, when capillaries are distinguishable from large vessels.

Gamma-GT activity has long been used as a biochemical marker for brain capillaries. Frey *et al.* [26] used immunohistochemical techniques to demonstrate that both cerebrovascular ECs and pericytes expressed this enzyme *in vivo* and *in vitro*. By comparing γ -GT activity in brain capillary ECs and pericytes, Risau *et al.* [18] showed that the latter cell type constituted the major source of this enzyme in brain capillaries. In the present study, we compared γ -GT activity in pericytes and SMCs *in vitro* and showed that this assay can be used as a marker for brain pericytes.

Western blot analysis was used to evidence P-gp expression by pericytes *in vitro*. This result agrees with previously published *in vivo* immunocytochemical data [27] and *in vitro* RT-PCR studies [15]. More recently, Shimizu *et al.* [19] used RT-PCR and immunocytochemistry to confirm P-gp expression in brain pericytes *in vitro* and compared the expression of transporters in brain, lung and peripheral nerve pericytes; brain and peripheral nerve pericytes had higher levels of P-gp mRNA than lung pericytes did. Our study is the first to show that P-gp is (i) more strongly expressed in pericytes than in vascular SMCs *in vitro* and (ii) functional in pericytes (as evidenced by differential accumulation of R123 in the presence and absence of verapamil). The Western blot results concerning P-gp expression were confirmed by this functional investigation in pericytes and vascular SMCs *in vitro*. The fact that pericytes express functional P-gp must be taken into account in EC selection procedures because the cells may escape from puromycin-induced death [19].

The Non-Contact Model

The non-contact model had a lower permeability to LY than the co-culture model did. This result agrees with previously published *in vitro* data [21]. Recent *in vivo* work by Armulik *et al.* [20] used adult pericyte-deficient mouse mutants, permeability studies and electron microscopy to demonstrate that the lack of pericytes increases the BBB's permeability to a range of low- and high-molecular-mass tracers (probably as a result of enhanced endothelial transcytosis). Platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) and PDGFR- β -knock-out mice have been useful in determining the impact of pericyte deficiency in the brain; the PDGF-B deficient mice die during late gestation as a result of capillary microaneurysm ruptures [28]. Endothelial hyperplasia, increased capillary diameter and transendothelial permeability have been described in viable PDGF-B- and PDGFR- β -deficient mice [28]. Hence, pericytes appear to be required for a functional BBB from embryogenesis through to adulthood [29]. Taken as a whole, these data demonstrate that pericytes are actively involved in BBB formation and maintenance.

Transporter expression in the non-contact model was studied with RT-PCRs on endothelial extracts; as in the co-culture model, ECs correctly express P-gp and MRP 1, 4, 5 and 6 transporters. Twenty-five PCR cycles were needed to observe P-gp, MRP1 and MRP4 transcripts; MRP5 was detected with 30 PCR cycles and MRP6 with 40 cycles. In contrast, MRP2, MRP3 and MRP7 were not amplified, as already reported and discussed by Berezowski *et al.* [15]. Our immunocytochemical results showed that the non-contact model's endothelial monolayer expressed P-gp and correctly localized tight junction proteins (occludin, ZO-1 and claudin-5). This set of results shows that the non-contact model described here is a potentially valuable *in vitro* model of the NVU, thanks to its endothelial tight junctions, efflux transporters and low permeability.

The Contact Model

The contact model exhibited a homogeneous monolayer with a low permeability to LY. In comparison with the model developed by Nakagawa *et al.* [21] (in which pericytes and ECs are cultured on opposite sides of a filter), our model allows close proximity between ECs and pericytes. Indeed electron microscopy provided evidence of very close contact (50-100 nm) between ECs and the underlying pericytes after 12 days of culture. Moreover, confocal microscopy showed that pericytes in the model should be able to contact several ECs (as *in vivo*).

Furthermore, the observed membrane interdigitations were reminiscent of the *in vivo* reciprocal, invaginating peg-and-socket contacts described in the literature [30]. The function of peg-and-socket contacts has not been clearly established but some authors have suggested that they anchor the pericytes to the endothelium and result from microvessel maturation and stabilization [31]. Physical contact between pericytes and ECs is reportedly necessary for preventing angiogenesis by inhibiting EC proliferation [32]. Moreover, the peg-and-socket junction space contains growth factors and other signaling molecules involved in pericyte-

endothelial cell crosstalk [33]. Taken as a whole, these data suggest that close and/or direct contacts between pericytes and ECs are required for normal intercellular interactions and stabilization at the capillary level.

The contact model appears to closely mimic the *in vivo* situation, thanks to its low permeability and functionally critical pericyte-EC interactions. Indeed, Daneman *et al.* [29] demonstrated that pericyte-EC interactions were critical in the regulation of the BBB's development; disruption of these interactions may lead to BBB dysfunction and neuro-inflammation. Fernández-Klett *et al.* [34] found that even though pericytes were not involved in neurovascular coupling *in vivo*, the cells were contractile and able to modulate cerebral capillary blood flow. In 2009, Yemisci *et al.* [12] demonstrated that pericytes constricted capillaries soon after ischemic insult *in vivo*. Pericytes also have this contractile ability *in vitro* [35]. It would be interesting to study the pericytes' behaviour in the event of ischaemic injury. In this respect, our model should be a valuable tool for monitoring cellular and molecular events in the various cell types during central nervous system injury and disease.

CONCLUSION

Recent *in vivo* and *in vitro* data show that brain pericytes are important elements in NVU pathophysiology [2,36]. Roles for pericytes and BBB are emerging for central nervous system pathology, thus emphasizing the need for refocusing drug discovery on the whole NVU target. A lack of understanding in NVU signalling could explain why current treatments for central nervous system diseases are not efficient.

Most available BBB models include ECs and astrocytes but lack pericytes. Even though care during pericyte isolation and culture is required to avoid misinterpretation, pericytes should be taken into account in *in vitro* models of the NVU. Depending on the question being addressed, the two three-cell-type models established and characterized herein should be useful tools for examining cellular and molecular events at the BBB level under normal and diseased conditions. The non-contact model will facilitate the analysis of ECs, whereas the contact model takes account of EC-pericyte physical interactions.

CONFLICT OF INTEREST

We certify that there are no conflicts of interest in relation to this article.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research leading to these results has received funding from the European Union's Seventh Framework Programme under grant contracts 201024 and 202213 (European Stroke Network). Elodie Vandenhoute has received a doctoral fellowship from the French Ministry of Research.

The authors thank Brigitte Arbeille for her help and advice on electron microscopy, and Caroline Mysiorek and Professor Katarzyna Nalecz for confocal microscopy images.

REFERENCES

- [1] Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, *et al.* Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6(8):650-61.
- [2] Fisher M. Pericyte signaling in the neurovascular unit. *Stroke* 2009;40(3 Suppl):S13-5.
- [3] Deli MA, Abraham CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol* 2005;25(1):59-127.
- [4] Prieto P, Blaauw BJ, de Boer AG, *et al.* Blood-brain barrier *in vitro* models and their application in toxicology. The report and recommendations of ECVAM Workshop 49. *Altern Lab Anim* 2004;32(1):37-50.
- [5] Banumathi E, Haribalaganesh R, Babu SS, Kumar NS, Sangiliyandi G. High-yielding enzymatic method for isolation and culture of microvascular endothelial cells from bovine retinal blood vessels. *Microvasc Res* 2009;77(3):377-81.
- [6] Cecchelli R, Coisne C, Dehouck L, *et al.* In: Dermietzel R, Spray DC, Nedergaard M, Eds. *Blood-Brain Barriers: From Ontogeny to Artificial Interfaces*. Weinheim, Wiley-VCH. 2006: 337-55.
- [7] Lundquist S, Renftel M. The use of *in vitro* cell culture models for mechanistic studies and as permeability screens for the blood-brain barrier in the pharmaceutical industry--background and current status in the drug discovery process. *Vascul Pharmacol* 2002;38(6):355-64.
- [8] Lai CH, Kuo KH. The critical component to establish *in vitro* BBB model: Pericyte. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;50(2):258-65.
- [9] Bonkowski D, Katyshev V, Balabanov RD, Borisov A, Dore-Duffy P. The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids Barriers CNS* 2011;8(1):8.
- [10] Bruinsma IB, Wilhelmus MM, Cox M, *et al.* Apolipoprotein E protects cultured pericytes and astrocytes from D-Abeta(1-40)-mediated cell death. *Brain Res* 2010;1315:169-80.
- [11] Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, *et al.* Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 2010;68(3):409-27.
- [12] Yemisci M, Gursay-Ozdemir Y, Vural A, *et al.* Pericyte contraction induced by oxidative-nitrate stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med* 2009;15(9):1031-7.
- [13] Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier *in vitro*. *J Neurochem* 1990;54(5):1798-801.
- [14] Shine HD, Haber B. Immunocytochemical localization of gamma-glutamyl transpeptidase in the rat CNS. *Brain Res* 1981;217(2):339-49.
- [15] Berezowski V, Landry C, Dehouck MP, Cecchelli R, Fenart L. Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an *in vitro* model of the blood-brain barrier. *Brain Res* 2004;1018(1):1-9.
- [16] Dehouck M-P, Vandenhaute E, Dehouck L, *et al.* In: Aschner M, Suñol C, Bal-Price A, Eds. *Cell Culture Techniques*. Breinigsville, PA, USA, Springer. 2011: 145-60.
- [17] Nehls V, Drenckhahn D. The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle? *Histochemistry* 1993; 99(1): 1-12.
- [18] Risau W, Dingler A, Albrecht U, Dehouck MP, Cecchelli R. Blood-brain barrier pericytes are the main source of gamma-glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries. *J Neurochem* 1992;58(2):667-72.
- [19] Shimizu F, Sano Y, Maeda T, *et al.* Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. *J Cell Physiol* 2008;217(2):388-99.
- [20] Armulik A, Genove G, Mae M, *et al.* Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 2010;468(7323):557-61.
- [21] Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, *et al.* A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 2009;54(3-4):253-63.
- [22] Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005;97(6):512-23.
- [23] Collett GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res* 2005;96(9):930-8.
- [24] Kirtan JP, Wilkinson FL, Canfield AE, Alexander MY. Dexamethasone downregulates calcification-inhibitor molecules and accelerates osteogenic differentiation of vascular pericytes: implications for vascular calcification. *Circ Res* 2006;98(10):1264-72.
- [25] Dore-Duffy P. Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des* 2008;14(16):1581-93.
- [26] Frey A, Meckelein B, Weiler-Guttler H, *et al.* Pericytes of the brain microvasculature express gamma-glutamyl transpeptidase. *Eur J Biochem* 1991;202(2):421-9.
- [27] Bendayan R, Ronaldson PT, Gingras D, Bendayan M. In situ localization of P-glycoprotein (ABCB1) in human and rat brain. *J Histochem Cytochem* 2006;54(10):1159-67.
- [28] Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, *et al.* Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2001;153(3):543-53.
- [29] Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 2010;468:562-6.
- [30] Allsopp G, Gamble HJ. An electron microscopic study of the pericytes of the developing capillaries in human fetal brain and muscle. *J Anat* 1979;128(Pt 1):155-68.
- [31] Caruso RA, Fedele F, Finocchiaro G, *et al.* Ultrastructural descriptions of pericyte/endothelium peg-socket interdigitations in the microvasculature of human gastric carcinomas. *Anticancer Res* 2009;29(1):449-53.
- [32] Orlidge A, D'Amore PA. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1987;105(3):1455-62.
- [33] Wakui S, Yokoo K, Muto T, *et al.* Localization of Ang-1, -2, Tie-2, and VEGF expression at endothelial-pericyte interdigitation in rat angiogenesis. *Lab Invest* 2006;86(11):1172-84.
- [34] Fernandez-Klett F, Offenhauser N, Dirnagl U, Priller J, Lindauer U. Pericytes in capillaries are contractile *in vivo*, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:22290-5.
- [35] Lee S, Zeiger A, Maloney JM, *et al.* Pericyte actomyosin-mediated contraction at the cell-material interface can modulate the microvascular niche. *J Phys Condens Matter* 2010;22(19):194115.
- [36] Kamouchi M, Ago T, Kitazono T. Brain pericytes: emerging concepts and functional roles in brain homeostasis. *Cell Mol Neurobiol* 2011;31(2):175-93.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Method

Confocal Microscopy on the Non-Contact Model

P-gp immunostaining scan was performed with an inverted DM IRE2 confocal and multiphoton microscope (Leica) equipped with argon and He-Ne lasers, with excitation and emission at 543 nm and 580–645 nm, respectively, for Alexa Fluor® 568. For Hoechst 33258, multiphoton excitation at 360 nm and detection at 400–460 nm were applied. Three-dimensional analysis was performed by Z-axis imaging of 0.16 µm-thick optical slices. Acquisitions were then analysed with LAS AF Lite confocal software (Leica).

Supplementary Table 1. Antibodies and Reagents Used for Immunostaining

	Antibody	Dilution	Reference	Supplier
Endothelial cells	rabbit anti-occludin	1/200	71-1500	Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
	rabbit anti-ZO-1	1/200	61-7300	Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
	rabbit anti claudin-5	1/100	34-1600	Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
	rabbit anti-vWF	1/200	A0082	Dako, Glostrup, Denmark
	mouse anti-Pgp	1/10	ab3083	Abcam, Cambridge, UK
Pericytes and SMCs	rabbit anti-PDGFR-β	1/100	ab51092	Abcam, Cambridge, UK
	mouse anti-α SMA	1/200	M0851	Dako, Glostrup, Denmark
	rabbit anti-NG2	1/200	ab5320	Millipore, Temecula, California, USA
	mouse anti-vimentin concentrate	1/100	18-0052	Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
Secondary antibodies	Alexa Fluor®488- conjugated goat anti-rabbit IgG	1/200	A11034	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
	Alexa Fluor®488- conjugated goat anti-mouse IgG	1/200	A11029	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
	Alexa Fluor®568- conjugated goat anti-rabbit IgG	1/200	A11036	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
	Alexa Fluor®568- conjugated goat anti-mouse IgG	1/200	A11034	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Other reagents	Hoechst 33258	4 µg/mL	190 304	ICN Pharmaceuticals, Basingstoke, UK
	Normal Goat Serum (NGS)	1/50	G6768	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France

From left to right: the antibody used, the antibody dilution (or reagent concentration), the reference number and the supplier (name, town/city and country).

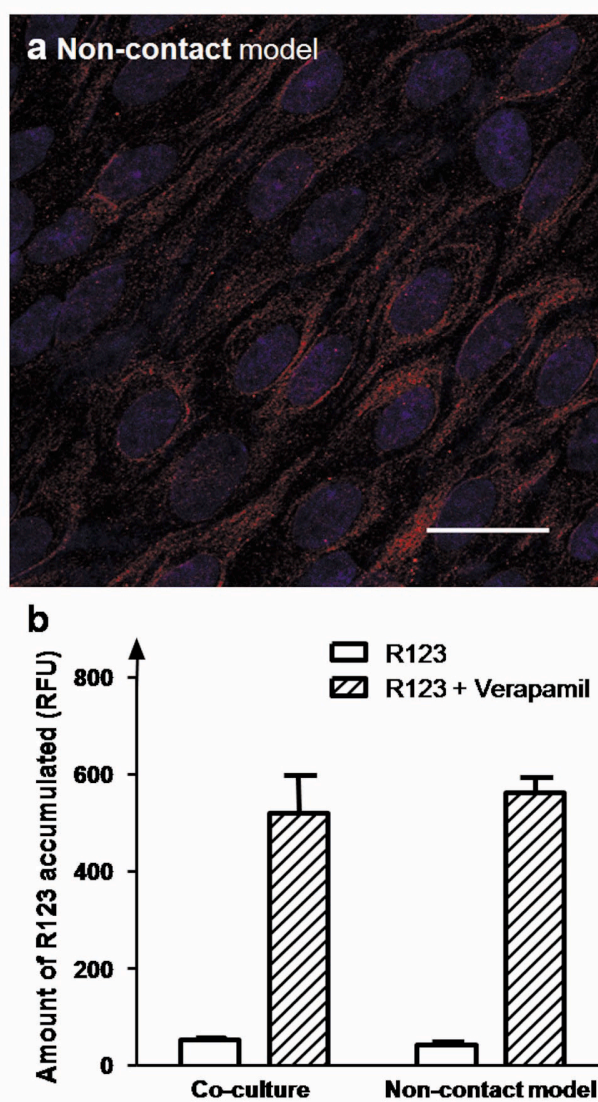
ZO-1: *zonula occludens*-1; vWF: von Willebrand Factor; P-gp: P-glycoprotein; PDGFR-β: platelet-derived growth factor receptor-beta; α-SMA: alpha-smooth muscle actin; NG2: neuron-glia 2

Supplementary Table 2. DNA Primers and PCR Conditions Used for Analysis of P-glycoprotein (P-gp) and Multidrug Resistance Protein (MRP) Transporter mRNA Expression in the Endothelial Monolayer from the Co-Culture Model and the Non-Contact Model

Target	Species	Accession no.	Primer F/R	Primer sequence	T _a (°C)	Amplification (bp)
P-gp	<i>Bos taurus</i>	AB006985	F	5' gCAAgAggAgCAgCTTATgAAg 3'	50	185
			R	5' ACTCCCTACCTTCAAgTTgAgg 3'		
MRP1	<i>Homo sapiens</i>	L05628	F	5' gCAACCCCGACTTCACCAAgTg 3'	55	199
			R	5' gTAgAAgAggTCTgCCCgCAg 3'		
MRP2	<i>Homo sapiens</i>	U49248	F	5' CTgCCTCTTCAGaATCTTAg 3'	55	241
			R	5' CCCAAgTTgCaggCTggCC 3'		
MRP3	<i>Homo sapiens</i>	U83659	F	5' gATACgCTCgCCACAgTCC 3'	60	262
			R	5' CAgTTgCCgTgATgTggCTg 3'		
MRP4	<i>Homo sapiens</i>	U83660	F	5' gACAACtggTgTgCCTTgCCAg 3'	55	154
			R	5' gTgTgCAATggTTAgCACggTg 3'		

Target	Species	Accession no.	Primer F/R	Primer sequence	T _a (°C)	Amplification (bp)
MRP5	<i>Homo sapiens</i>	U83661	F	5' gAgACTgTggCAAgAAgAgCTg 3'	60	117
			R	5' gTgATCATCAggCACACgATgg 3'		
MRP6	<i>Homo sapiens</i>	AF076622	F	5' gTgATCCCAAgCCTCCAgCCTg 3'	65	260
			R	5' ggTAgAggACgCTCTCggTCAg 3'		
MRP7	<i>Homo sapiens</i>	BAA9227	F	5' CTgAACTCAGACCgggTgC 3'	55	149
			R	5' gggACCTCCgAgTgAg 3'		
β-actin	<i>Rattus norvegicus</i>	NM_031144	F	5' gAAGTACCCCATgAACACg 3'	50	177
			R	5' ggTCTCAAACATgATCTggg 3'		

From left to right: cDNA targeted for amplification, species, cDNA accession number from the NCBI database, forward (F) and reverse (R) primer designation, PCR annealing temperature in °C and size of the amplified cDNA band in bp.



Supplementary Fig. (1). Study of P-glycoprotein (P-gp) expression (a) and function (b) in the non-contact model.

(a) A maximum-intensity projection through a triple-channel optical section series of ECs from the non-contact model, with immunostaining for P-gp (red) and Hoechst 33258 staining (in blue). Scale bar = 50 μm

(b) P-gp function was assessed *via* the accumulation of substrate (rhodamine 123, R123) in the presence and absence of the inhibitor verapamil in ECs from the non-contact model (n = 3).

1.2 Discussion

1.2.1 Les péricytes, un type cellulaire méconnu et insaisissable

In vivo, les péricytes se caractérisent par leur localisation périendothéliale et leur enchâssement dans une membrane basale commune avec les cellules endothéliales. En revanche les CMLs, au niveau des artères, sont entourées par une couche de membrane basale indépendante et distinguable de celle des cellules endothéliales sous-jacentes. Cette caractéristique est donc utilisable pour identifier les péricytes en microscopie électronique, de même que les techniques de microscopie qui permettent d'évaluer le diamètre des vaisseaux sanguins rendent possible la distinction entre les capillaires et les plus gros vaisseaux. Les cellules périendothéliales des vaisseaux intermédiaires (artérioles) sont, selon les auteurs, considérées comme des péricytes ou des CMLs, suggérant un phénotype intermédiaire graduel le long de l'arbre vasculaire (Armulik *et al.*, 2005).

In vitro leur identification est plus difficile, étant donnée qu'aucun marqueur phénotypique spécifique des péricytes n'a pour l'instant été identifié (Dore-Duffy et Cleary, 2011). De plus, ce type cellulaire est multipotentiel et est connu pour se différencier au fur et à mesure de la culture et des amplifications (Shiwen *et al.*, 2009). Les préparations de capillaires isolés peuvent aussi être contaminées par des fragments de plus gros vaisseaux, entraînant une contamination de la culture de péricytes par des CMLs, qui présentent de nombreux marqueurs en commun avec eux. **Ces données soulignent l'importance de l'isolement et de la caractérisation des péricytes en culture, car le risque de travailler avec des cultures contaminées et/ou différenciées est importante, menant à des interprétations erronées dans ces conditions (Armulik *et al.*, 2005).**

Notre premier objectif a donc été de se prémunir au mieux de la contamination des cultures de péricytes cérébraux par des CMLs, et d'éviter leur dé- ou trans-différenciation, notamment en limitant leur sous-culture à trois passages au maximum (Dehouck *et al.*, 1997). Les péricytes et CMLs présentent de très nombreux marqueurs en commun, mais nos résultats indiquent que **les péricytes cérébraux présentent une activité γ -GT et une expression de la P-gp plus élevées par rapport aux CMLs vasculaires**. Ces données peuvent donc être mises à profit afin de distinguer ces deux types cellulaires en culture. Ces résultats suggèrent en outre que les péricytes pourraient constituer un complément aux propriétés métaboliques des cellules endothéliales formant la BHE, puisque la P-gp et la γ -GT sont respectivement une pompe d'efflux et une enzyme de dégradation. L'expression de la P-gp par les péricytes avait déjà été suggérée par des études menées *in vitro* (Berezowski *et al.*,

2004; Shimizu *et al.*, 2008) et *in vivo* par immunohistochimie (Bendayan *et al.*, 2006).

1.2.2 Intégration des péricytes au sein d'un modèle *in vitro* de BHE

Afin de modéliser l'unité glio-vasculaire, nous avons ajouté les péricytes cérébraux au sein du modèle de coculture incluant cellules endothéliales cérébrales et cellules gliales (Dehouck *et al.*, 1990), selon deux configurations différentes.

1.2.2.1 Modèle de triculture sans contact direct entre péricytes et cellules endothéliales

Dans ce premier cas, les péricytes cérébraux ont étéensemencés à la surface d'un gel de collagène recouvrant les cellules gliales cultivées en fonds de puits, alors que les cellules endothéliales sont cultivées à la surface du filtre (**triculture sans contact**). Cette configuration permet une étude aisée des cellules endothéliales, mais aussi l'observation des péricytes au microscope à contraste de phase tout au long de leur culture.

La monocouche endothéliale formée dans ce modèle présente une faible perméabilité au jaune Lucifer significativement plus faible que la perméabilité obtenue dans le modèle de coculture original. Ce résultat suggère que les péricytes ont un effet hypoperméabilisant au niveau des cellules endothéliales cérébrales en synergie avec l'effet des cellules gliales, en accord avec les résultats obtenus par Nakagawa *et al.* (2007). En effet dans cette étude les monocouches endothéliales en triculture présentaient une perméabilité paracellulaire significativement plus faible que les monocouches cocultivées en présence de cellules gliales, ainsi que des TEERS supérieures. Le modèle présentant la plus haute TEER correspondait à la triculture où les péricytes sont cultivés à proximité des cellules endothéliales. Des observations similaires ont été faites par Al Ahmad *et al.* (2009). De même, Hatherell *et al.* (2011) ont démontré en testant aussi ces différentes configurations, que la TEER la plus élevée était obtenue en condition de triculture. L'effet hypoperméabilisant des péricytes au niveau des cellules endothéliales a aussi été observé en coculture (Dohgu *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2009).

Quelques auteurs ont en revanche observé une augmentation de la perméabilité (ou une diminution de la TEER) au niveau des cellules endothéliales en présence de péricytes (Ruchoux *et al.*, 2002; Thanabalasundaram *et al.*, 2011a, 2010). Il faut d'ailleurs noter que les conditions de culture

semblent avoir des conséquences importantes sur l'influence des péricytes au niveau endothélial car récemment, [Thanabalasundaram et al. \(2011b\)](#) ont démontré que des péricytes traités avec du b-FGF (négatifs pour l' α -actine de muscle lisse) stabilisent l'intégrité de la BHE en coculture, alors que les péricytes traités avec du TGF- β (positifs pour l' α -actine de muscle lisse) entraînent une diminution la TEER dans un modèle porcin. Ces observations montrent la versatilité et la dynamique du phénotype des péricytes, mettant en lumière l'importance du milieu de culture sur le phénotype de ces cellules *in vitro*, pouvant aussi expliquer les divergences de résultats selon les équipes.

Les cellules endothéliales en triculture sans contact présentent une localisation corticale des protéines des jonctions serrées et expriment l'ARN_m de différentes pompes d'efflux. Les pompes d'efflux exprimées ou non par les cellules endothéliales en triculture sont les mêmes qu'en coculture, avec des taux d'expression sensiblement identiques, suggérant que **les péricytes influencent peu l'expression transcriptionnelle des transporteurs d'efflux au niveau des cellules endothéliales en triculture**. De la même manière, l'étude menée *in vivo* par [Armulik et al. \(2010\)](#) indique qu'une déficience en péricytes n'induit pas de modification significative de l'expression transcriptionnelle des pompes d'efflux au niveau des cellules endothéliales cérébrales.

Puisqu'il présente les caractéristiques de la BHE *in vivo*, le modèle de triculture sans contact constitue un modèle *in vitro* valable de la BHE.

1.2.2.2 Modèle de triculture avec contact direct entre péricytes et cellules endothéliales

Étant donnée l'importance supposée des contacts entre péricytes et cellules endothéliales lors de l'établissement de la BHE et dans la communication entre ces deux types cellulaires, il semble nécessaire de les cultiver à proximité. Dans ce but, certaines équipes les ont donc rapproché en les ensemençant de part et d'autre d'un filtre ([Nakagawa et al., 2009](#)) ; ces conditions permettent certes une proximité mais la possibilité d'établir des contacts directs est très restreinte. Nous avons donc tenté une approche différente, bien que plus délicate à mettre en place, consistant à ensemencher les péricytes et les cellules endothéliales dans le même compartiment, tout en essayant de respecter la configuration physiologique de l'unité glio-vasculaire. En effet, de la lumière du capillaire au parenchyme cérébral se succèdent les cellules endothéliales, les péricytes puis les astrocytes, c'est donc en ensemençant les péricytes directement sous les cellules endothéliales que nous avons mis en place le modèle de **triculture avec contact**.

La perméabilité du modèle ainsi formé est équivalente à celle obtenue dans la coculture classique. Puisque cellules endothéliales et péricytes sont cultivés dans le même compartiment, l'étude des cellules endothéliales n'est pas aisée car toute extraction d'ARN_m ou de protéines proviendra de la lyse des deux types cellulaires. L'immunomarquage de l' α -actine de muscle lisse permet de visualiser les péricytes, et celui du facteur von Willebrand permet l'observation des cellules endothéliales au sein du modèle : les images obtenues indiquent que les péricytes, dont la taille est plus importante que celle des cellules endothéliales et qui présentent de nombreux prolongements, peuvent contacter plusieurs cellules endothéliales, comme c'est le cas *in vivo* (Diaz-Flores *et al.*, 2009). Nous avons donc ensuite vérifié la proximité et la présence de contacts directs entre péricytes et cellules endothéliales.

L'observation en microscopie corrélative de la culture mixte obtenue montre que les cellules endothéliales forment une monocouche régulière au dessus de péricytes disséminés. À fort grossissement, il a pu être déterminé que la distance moyenne entre les membranes des deux types cellulaires avoisinait les 50 nm, et des zones d'interdigitations entre les membranes endothéliales et péricytaires ont pu être distinguées. **Ce type d'interdigitation a déjà été décrit *in vivo* sous le nom de jonctions « peg-and-socket »** (Allsopp et Gamble, 1979), dont la fonction exacte n'est pas encore clairement établie. Dans notre modèle, une légère densification de la membrane plasmique au niveau de la zone d'apposition des membranes suggère un début de différenciation de ce contact. Ces zones d'interdigitation renfermeraient des facteurs de croissance et des molécules de signalisation permettant des intercommunications cellulaires, et seraient nécessaires à l'activation du TGF- β (Wakui *et al.*, 1997, 1990, 2006). **Les informations concernant la nature, la fréquence et la fonction des différents types de jonctions existant entre péricytes et cellules endothéliales au niveau des capillaires cérébraux reste à ce jour très parcellaire**, mais il a par exemple déjà été démontré *in vitro* que les contacts directs sont nécessaires à l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales par les péricytes (Orlidge et D'Amore, 1987).

De plus, la sécrétion de matériel extracellulaire observée entre péricytes et cellules endothéliales peut aussi intervenir dans les intercommunications, soulignant la richesse des interactions possibles entre eux au sein de notre modèle. Ce modèle de triculture avec contact entre péricytes et cellules endothéliales représente donc fidèlement l'organisation de l'unité glio-vasculaire, présentant les caractéristiques nécessaires à un modèle de la BHE. Il a nécessité une mise au point et nécessite une

attention toute particulières pour son maintien en culture. Notamment, le nombre de péricytes a du être fortement réduit pour pouvoir maintenir le modèle pendant 12 jours, car leur prolifération peut entraîner la formation de trous dans la monocouche endothéliale et donc une augmentation de la perméabilité .

Ces modèles *in vitro* permettent donc de modéliser l'unité glio-vasculaire, en regroupant les trois populations cellulaires formant la BHE (cellules endothéliales, péricytes et cellules gliales) dans deux configurations différentes, permettant une communication entre cellules endothéliales et péricytes *via* des facteurs solubles uniquement (triculture sans contact) ou *via* des facteurs solubles et des contacts directs entre eux (triculture avec contact). Leur caractérisation indique qu'ils constituent des modèles fiables de la BHE, et qu'ils ont donc leur place dans le cadre de l'étude des intercommunications cellulaires ayant lieu en conditions physiologiques et pathologiques *in vitro*.

Mise en place et caractérisation d'un modèle *in vitro* de BHE adapté au criblage de molécules

UN MÉDICAMENT à visée cérébrale ne peut exercer son effet pharmacologique que s'il atteint le parenchyme cérébral à une concentration suffisante et pendant un temps assez long pour lui permettre d'agir sur sa cible. L'efficacité du traitement sera donc fonction de la pénétration cérébrale du médicament, qui dépend de différents paramètres. Pour éviter des échecs dus à une exposition cérébrale insuffisante, les différents aspects intervenant doivent être évalués le plus tôt possible lors du processus de découverte de médicaments.

Parmi les paramètres qui influencent dans la pénétration cérébrale d'une molécule, la valeur de perméabilité endothéliale (P_e) indique la vitesse à laquelle une molécule traversera la BHE. Cet aspect est particulièrement important pour les médicaments ciblant la douleur, les crises d'épilepsie ou les AVCs par exemple, car dans ce cas ils doivent atteindre leur concentration effective le plus rapidement possible. *In vivo*, la perméabilité de la BHE peut être déterminée avec précision grâce à la technique de perfusion cérébrale *in situ*. Cependant, la difficulté d'exécution et le coût de cette technique ne lui permettent pas d'être utilisée dans les étapes précoces de la découverte de médicaments, lors desquelles de très nombreux composés doivent être criblés. En revanche, l'utilisation de modèles *in vitro* de BHE permet d'obtenir cette information de manière plus aisée et plus rapide, permettant l'étude d'un plus grand nombre de composés à la fois tout en réduisant le nombre d'animaux nécessaires aux expérimentations.

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux modèles *in vitro* de BHE existent et diffèrent selon les types cellulaires qu'ils intègrent et les caractéristiques qu'ils présentent (Tóth *et al.*, 2011). Aucun d'entre eux ne fait cependant l'unanimité dans l'industrie pharmaceutique, car aucun ne remplit tous les critères inhérents à leur utilisation dans les étapes précoces de découverte de médicaments (Reichel, 2006, 2009). En effet, le modèle « idéal » doit être facile et rapide à mettre en œuvre en routine, être peu coûteux, être prédictif de la perméabilité *in vivo* et présenter un débit suffisant pour permettre l'évaluation du grand nombre de molécules émanant des premières étapes du processus de découverte de médicaments.

Afin de mettre à profit les avantages des modèles de coculture et d'apporter une simplification à leur mise en place, *Culot et al.* (2008) ont modifié le modèle développé par *Dehouck et al.* (1990) (**Figure 1a**) afin de l'adapter au criblage rapide de molécules :

- en miniaturisant le modèle au format 24 puits à la place du format 6 puits originel, permettant son utilisation par des systèmes robotisés ;
- en mimant l'influence des cellules gliales par l'utilisation d'un milieu inducteur, contenant du milieu conditionné de coculture ;
- et en réduisant le temps de culture du modèle de 12 jours à seulement 4 jours après ensemencement des cellules endothéliales cérébrales.

Ce modèle présente les caractéristiques de la BHE, dont l'expression des protéines des jonctions serrées, une faible perméabilité paracellulaire et l'expression de transporteurs d'efflux fonctionnels, dont la P-gp et différentes MRPs. Il présente également une bonne prédictibilité du passage des composés à travers la BHE *in vivo*, comme le démontre la corrélation entre les valeurs de perméabilité obtenues *in vitro* et à l'aide de la perfusion cérébrale *in situ* ($R^2 = 0,88$; $n = 10$) (*Culot et al.*, 2008). Ce modèle simplifié est dédié au criblage rapide de molécules, permettant d'évaluer rapidement et à grande échelle le passage de composés à travers la BHE. Sa mise en place nécessite cependant toujours une étape critique de trypsinisation des cellules endothéliales avec un temps total de mise en place et de maintien des cultures pendant 7 jours au total (**Figure 1b**) avant utilisation.

2.1 Résultats

Pour simplifier encore ce modèle et le rendre aisément utilisable en routine, nous avons ensemencé les cellules endothéliales dans les filtres puis avons congelé l'ensemble (plaques 24 puits et cellules endothéliales tout juste ensemencées dans les filtres, **Figure 1c**). Ainsi, l'utilisateur final n'a besoin d'aucune connaissance particulière en culture de cellules endothéliales pour pouvoir utiliser ce modèle. Celui-ci est prêt seulement 4 jours après décongélation, et nécessite simplement deux renouvellements du milieu. Pour déterminer si ce modèle présente les principales caractéristiques de la BHE *in vivo*, il a été caractérisé en terme d'expression des protéines des jonctions serrées (**Figure 2a**) et de perméabilité paracellulaire (**Figure 2b**).

La faible perméabilité de ce modèle au jaune Lucifer, utilisé comme marqueur d'intégrité, est similaire à celle du modèle de Culot *et al.* (2008), et est très reproductible ($n = 147$ monocouches testées). Ce modèle est utilisable jusqu'à 8 semaines de stockage à -80°C (**Figures 2b** et **2c**). L'immunomarquage des protéines des jonctions serrées (occludine, claudine-5, ZO-1 et JAM) montre leur localisation corticale au niveau des cellules endothéliales. La monocouche endothéliale obtenue exprime aussi des pompes d'efflux fonctionnelles, comme l'attestent l'immunomarquage de la P-gp (**Figure 2a**) et l'étude de sa fonctionnalité (**Figure 3a**). En effet, la rhodamine 123 et la quinidine sont des substrats de la P-gp et le vérapamil un de ses inhibiteurs : en présence de vérapamil, l'accumulation de rhodamine 123 dans les cellules endothéliales (**Figure 3a**) et le transport de la quinidine au travers des cellules endothéliales (**Figure 3b**) sont augmentés, attestant de la fonctionnalité des pompes d'efflux dans ce nouveau modèle.

Enfin, un panel de 33 molécules (incluant des médicaments à visée cérébrale et périphérique, substrats ou non de la P-gp) a été testé en parallèle sur ce modèle et sur celui développé par Culot *et al.* (2008). Les résultats de l'étude de la perméabilité démontrent une bonne corrélation entre les deux ($R^2 = 0,87$, avec $n = 3$ monocouches testées par molécule, **Figure 3c**).

Adapting *in vitro* blood-brain barrier models for use in early-stage drug discovery

Elodie Vandenhoute^{1,2,3}, Emmanuel Sevin^{1,2,3}, Dorothée Hallier-Vanuxeem^{1,2,3}, Marie-Pierre Dehouck^{1,2,3}, Roméo Cecchelli^{1,2,3}

¹ Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

² UArtois, LBHE, F-62300 Lens, France

³ IMPRT-IFR114, F-59000 Lille, France

Corresponding author: Professor Cecchelli, R. (romeo.cecchelli@univ-artois.fr)

Keywords: blood-brain barrier, early-stage drug discovery, high-throughput screening, *in vitro* models, permeability

Abstract

Several parameters influencing the brain distribution of compounds must be considered when designing potential neuropharmaceuticals in early-stage drug discovery. The blood-brain barrier (BBB) represents an obstacle for drug penetration into the brain. Many *in vitro* BBB models have proven useful for predicting the BBB permeation rate, but do not meet all criteria for use in early-stage drug discovery: feasibility, rapidity, reliability and a low requirement for human resources. To meet this demand, we have developed a robust, higher-throughput, cell-based model exhibiting BBB features (low paracellular permeability, functional efflux pumps and the correct endothelial phenotype). This system comes in a ready-to-use, frozen format, appropriate for in-house use by both large pharmaceutical firms and small-biotech companies in early-stage drug discovery.

The development of drugs for treating central nervous system (CNS) disorders is a medically challenging and commercially risky field. The blood-brain barrier (BBB) is likely to hinder drug candidate's access to pharmacological targets located within the brain parenchyma. Indeed, brain capillaries are the main entry route into the CNS, but can also prevent neuropharmaceuticals from reaching the brain parenchyma at an effective dose. Consequently, a drug candidate's therapeutic potential is not only related to its activity at the target but also to its ability to attain an effective dose at the target site. Ideally, this issue should be addressed early in the drug discovery process.

Pharmacokinetic parameters of CNS drug exposure

The ability of a CNS drug to achieve an adequate concentration-time profile at the target brain site (sufficient in terms of both concentration and duration) depends on a variety of parameters [1,2].

Since it is considered that only the unbound brain concentration is available for interaction with most CNS receptors, it is essential to determine this parameter for candidate CNS drugs. To this end, brain microdialysis technique [3] can provide useful information by determining the concentration of unbound drug

in the brain interstitial fluid. However, this technique is resource-intensive and not broadly applicable, due to probe recovery problems with lipophilic compounds. Consequently, brain microdialysis is usually reserved for drugs in the development stage. Although the determination of total brain/plasma ratios in rodents and of the brain unbound fraction (estimated from either brain homogenates or brain slice technology) and the subsequent transformation of total brain concentrations into unbound brain concentrations may provide a surrogate measure of free drug concentration within the parenchyma, this approach is not practical for routine screening.

An additional issue relates to the complexity of the processes that determine a compound's brain/plasma ratio of a compound, which makes it difficult to derive strategies for the subsequent medicinal chemistry efforts during lead optimization. Indeed, the brain/plasma ratio is a distribution parameter depending on several factors, including the rate of permeation across the BBB and the compound's degree of binding to plasma proteins in the blood [4] and brain tissue in the CNS.

In lead optimization projects, the objective is therefore to identify and successively eliminate the different parameters responsible for a poor

brain distribution. Consequently, the rationale for optimizing drug metabolism and pharmacokinetics is generally driven by the use of a cascade of *in vitro* assays and *in vivo* studies of increasing complexity and predictability.

To fully understand brain drug delivery and its consequences for central drug action, it is now commonly accepted that the rate of delivery (which depends on BBB's permeability to the compound in question) must be considered separately from (i) the extent of equilibration across the BBB and (ii) the intra-brain distribution [5]. Accordingly, a high rate of transport across the BBB is not necessarily predictive of a high ratio measured under steady-state conditions. Nevertheless, this parameter is of particular importance for compounds with indications such as pain, epilepsy and stroke since they need to reach their peak brain concentration rapidly, which is unlikely to happen if the rate of transport across the BBB is low.

Predicting BBB permeation rate in early-stage drug discovery

Although the *in situ* brain perfusion [6] is considered as the most accurate method for measuring the rate of permeation across the BBB, practical considerations mean that this technique is seldom used in early-stage drug discovery. In contrast, *in vitro* BBB models have the potential to fulfil the practical criteria for drug discovery but choosing one has always involved a compromise between capacity, time, predictability and cost [7].

To the best of our knowledge, none of the available immortalized brain endothelial cell (EC) lines exhibit sufficient tightness to provide a reliable *in vitro* tool for the prediction of BBB permeation rates [8]. Hence, easily-cultured non-brain cell lines known to achieve tight, reproducible barriers such as Caco-2 and Madin-Darby Canine Kidney cells have been used to study diffusional transport [9] and to rank drugs in term of passive diffusion across the BBB. However, their usefulness remains questionable because they exhibit different transporter expression levels [10] as well as different membrane composition and characteristics in comparison with endothelial cells (ECs) [11].

Some of these cell lines have been transfected to express human efflux transporters (such as P-glycoprotein (P-gp) [12] and BCRP [13]): the ratios between basal-to-apical and apical-to-basal permeability coefficients (known as 'efflux ratios') are frequently used to identify cellular efflux pump substrates. In this frame, other elegant models have been developed such as the recently described grasshopper *ex vivo* model, which exhibits a proper P-gp functionality, as in the mammalian BBB [14]. This knowledge is of considerable value for avoiding adverse drug interactions at the BBB and is useful for medicinal chemists, since efflux mechanisms may explain (at least in part) a poor CNS distribution. However, high efflux ratios are not necessarily associated with low *in vivo* permeability and some marketed CNS drugs are known to be efflux pump substrates [15]. Consequently, predicting BBB permeation rates with cell lines that over-express efflux transporters could preclude some potential effective CNS drug candidates from entering subsequent *in vivo* development stages.

In order to predict the BBB permeation rate, *in vitro* models should have as many of the *in vivo* brain endothelium's relevant properties as possible [9]; this is not the case for non-brain-derived cell lines that rather express an epithelial phenotype.

Primary-culture and low-passage brain ECs have been extracted from various species to design BBB models: bovine [16], porcine [17], rat [18], mouse [19] but also human [20]. They are known to closely mimic the *in vivo* BBB, particularly when co-cultured with glial cells, since the latter are known to induce and maintain the BBB phenotype *in vitro* [21]. A well-characterized *in vitro* BBB model can also prove useful for studying (i) mechanistic aspects of transport and (ii) biological and disease processes related to the BBB [22]. However, as already pointed out by Andreas Reichel [7], none of the currently available *in vitro* BBB models meets all the pharmaceutical industry's requirements for use in early-stage drug discovery: feasibility, rapidity, ease-of-use, reliability and low requirement for human resources.

In the early 1990's, our laboratory developed a co-culture model of the BBB [16] that enabled the investigation of a drug's cellular and

molecular effects on the BBB and provided a powerful alternative to the *in vivo* determination of the rate of BBB transport [23]. Since this original model requires a significant amount of expertise and continuous, routine work by dedicated lab workers to produce useful and reproducible results, only a few pharmaceutical companies adopted it for in-house use.

In order to combine the advantages of a well-characterized *in vitro* BBB model with a simpler procedure for permeability screens, we have developed an *in vitro* BBB model that can easily be used in-house in both large pharmaceutical companies with major CNS programmes and smaller biotech companies with an occasional need for knowledge of BBB permeability.

A 24-well miniaturized BBB model

In an initial attempt to design a predictable, higher-capacity *in vitro* BBB model, we modified the original, well-characterized coculture model set up in the 1990's, based on the coculture between bovine brain capillary endothelial cells (BBCECs) and rat glial cells [16] (Fig. 1a). The simplification consisted in miniaturizing the format (with 24-well plates instead of 6-well plates), reducing the use of glial cells and shortening the duration of the cell culture step (4 days instead of 12 days) (Fig. 1b). In this model [24], the inductive influence of glial cells and crosstalk between endothelial cells and glial cells is mimicked by the use of 'BBB-inducing medium', containing coculture-conditioned medium and selected sera. The use of coculture-conditioned medium allows decreasing the number of animals necessary for experiments, because it can easily be gathered and frozen for later use. A functional BBB model, with the correct localization of tight junction proteins and the functional expression of P-gp and several other efflux transporters, is obtained just 4 days after BBCEC seeding. As the original coculture model, this model presents a low permeability to Lucifer Yellow and sucrose (used as integrity markers). Furthermore, it shows a good correlation between the measured *in vitro* permeability values and *in vivo* BBB permeability (as assessed by *in situ* brain perfusion, [24]).

A ready-to-use (RTU) BBB model

Trypsinization of BBCECs (Fig. 1b) requires technical skill and adequate training, and represents the most critical step in establishment of the 24-well model in the screening lab because BBCECs are very sensitive to this manipulation. Hence, in order to create an even more user-friendly *in vitro* BBB model and to guarantee a reproducible low permeability and phenotype, BBCECs were seeded in 24-filter plates (at a density of 30,000 cells/cm²), immediately stored at 0°C for 1H upon seeding in the inserts, and finally transferred at -80°C afterwards for freezing the entire system, for future shipment and use in another laboratory. Thanks to the freezing step, the final user does not need specific knowledge of brain EC culture and subculture. The time necessary for the whole experiment is substantially reduced because no preparation of BBCEC culture is needed: the new model is ready for use 4 days after thawing (Fig. 1c). Immunocytochemical assays show that the BBCECs form a regular monolayer of tightly packed, non-overlapping cells with correctly localized tight-junction proteins (Fig. 2a), suggestive of a restrictive paracellular pathway. Permeability to the fluorescent non-permeant marker Lucifer yellow remained low for cultures thawed after up to 8 weeks of storage at -80 °C (Fig. 2b). The permeability measured in the RTU model was as low as that obtained in the original 24-well model (Fig. 2c) and attests to the reproducible tightness of the cell barrier (n = 147).

Expression of P-gp - an important BBB feature - in the RTU model was demonstrated by immunocytochemistry (Fig. 2a). Similarly, the presence of efflux pumps was assessed by RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction), revealing the transcriptional expression of other efflux transporters - P-gp, MRP1, MRP4 and MRP5 (data not shown) - as described in the original 24-well model [24] and co-culture model [25]. The functionality of efflux pumps was evidenced by greater uptake of rhodamine 123 (R123, 20 µM) by the BBCECs (Fig. 3a) and greater permeability of the BBB to quinidine (10 µM, Fig. 3b) in the presence of verapamil (25 µM). Furthermore, we found a strong correlation ($R^2 = 0.87$) between the permeability values measured for 33 marketed drugs (comprising CNS and

peripheral acting drugs, P-gp and non-P-gp substrates exhibiting different molecular weights and lipophilicity) using the RTU model and the 24-well miniaturized model, respectively (Fig. 3c).

Conclusion and future opportunities

The RTU system described herein appears to be more suitable than previously characterized models for use in higher-throughput BBB permeability screens. It reproduces the *in vivo* BBB phenotype well, with reproducible, low paracellular permeability and functional efflux pumps. The RTU system can be rapidly prepared for use and is easy to handle; as such, it offers pharmaceutical and smaller biotech companies an opportunity to generate useful BBB permeation data in-house. This enables information on drug optimization to be fed back rapidly to the medicinal chemists.

Determining the rate of BBB transport (i.e. permeability) at an early stage in the drug discovery process helps to predict whether drug candidates are likely to achieve high enough CNS exposure to elicit the desired pharmacological effect – a parameter which has to be confirmed *in vivo* later in the development process. To facilitate compound selection, it may be necessary to relate potency to the estimated unbound brain concentration. Recently, high-throughput *in vitro* methods for rapid determination of brain tissue binding have been developed [26] and constitute a relevant means of predicting the extent of brain penetration based on *in vitro* and *in silico* models. In the future, we intend to extend the use of our *in vitro* BBB models for the assessment of blood/brain partitioning. In fact, by combining the latter data with knowledge of the unbound brain fraction, it should be possible to predict the unbound concentrations of a therapeutic agent reaching the CNS at an early stage in the drug discovery process.

The BBB restricts the access of many conventional, low-molecular-weight compounds to their CNS targets. Therefore, the delivery of biotherapeutics to the brain represents an even greater challenge and will require a better understanding of the active and passive processes governing transport across the BBB. Accordingly, identifying a brain delivery strategy for biopharmaceuticals will

become essential. Several peptides, proteins, cytokines and neurotrophins are transported across the BBB by endogenous mechanisms, some of which may be exploitable for brain delivery. The use of antibodies for receptor-mediated transport across the BBB may be one way of interacting with targets currently beyond the scope of small-molecule drugs [27].

To this end, the use of *in vitro* models derived from human cells may well be crucial for the successful evaluation and development of large-molecule therapeutics. Up to now, several reasons prevent primary human brain ECs and human brain EC lines from being used in permeability screens. Indeed, primary human brain endothelial cells can't be provided on a regular basis and the yield of endothelial cells from human surgical samples is low. As a consequence, they cannot be used in permeability screens within the pharmaceutical industry, at least in early-stage drug discovery, where high throughput screening is needed. However, their use might help in later stages (for example in the development process) for confirming and refining the predictions made earlier, as soon as optimized molecules have been generated and selected. Concerning human endothelial cell lines, the currently available ones do not provide high paracellular restriction enough to be useful in permeability screens, even if their high throughput and ease of culture are of advantage in this case. Another possibility would be to use human pluripotent stem cells, as it may constitute a new way of obtaining a reliable human *in vitro* BBB model if they can be made to differentiate into ECs [28,29] displaying the BBB phenotype. Their great self-renewing potency would allow a high yield, and taking advantage of intercellular communication of the neurovascular unit-forming cells in coculture conditions may permit these ECs to acquire the BBB phenotype *in vitro*. With an efficient differentiation and maintenance of BBB features in culture, scientists could successfully design human stem cell-based models, on the basis of other successful applications of this strategy in other fields [30].

Acknowledgements: The authors warmly thank Maxime Culot, Stefan Lundquist, Rachid Aijjou and Lucie Dehouck for their assistance with this study.

REFERENCES

- 1 Jeffrey P. and Summerfield S. (2010) Assessment of the blood-brain barrier in CNS drug discovery. *Neurobiol Dis* 37, 33-37
- 2 Di L. *et al.* (2008) Strategies to assess bloodbrain barrier penetration. *Expert Opinion on Drug Discovery* 3, 677-687
- 3 Aasmundstad T. A. *et al.* (1995) Distribution of morphine 6-glucuronide and morphine across the blood-brain barrier in awake, freely moving rats investigated by in vivo microdialysis sampling. *J Pharmacol Exp Ther* 275, 435-441
- 4 Smith D. A. *et al.* (2010) The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 9, 929-939
- 5 Hammarlund-Udenaes M. *et al.* (2008) On the rate and extent of drug delivery to the brain. *Pharm Res* 25, 1737-1750
- 6 Takasato Y. *et al.* (1984) An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am J Physiol* 247, H484-493
- 7 Reichel A. (2006) The role of blood-brain barrier studies in the pharmaceutical industry. *Curr Drug Metab* 7, 183-203
- 8 Toth A. *et al.* (2011) Patented in vitro blood-brain barrier models in CNS drug discovery. *Recent Pat CNS Drug Discov* 6, 107-118
- 9 Gumbleton M. and Audus K. L. (2001) Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J Pharm Sci* 90, 1681-1698
- 10 Lacombe O. *et al.* (2011) In vitro primary human and animal cell-based blood-brain barrier models as a screening tool in drug discovery. *Mol Pharm* 8, 651-663
- 11 Di L. *et al.* (2009) Comparison of blood-brain barrier permeability assays: in situ brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *J Pharm Sci* 98, 1980-1991
- 12 Pastan I. *et al.* (1988) A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4486-4490
- 13 Xiao Y. *et al.* (2006) A 96-well efflux assay to identify ABCG2 substrates using a stably transfected MDCK II cell line. *Mol Pharm* 3, 45-54
- 14 Nielsen P. A. *et al.* (2011) Models for predicting blood-brain barrier permeation. *Drug Discov Today* 16, 472-475
- 15 Summerfield S. G. *et al.* (2007) Central nervous system drug disposition: the relationship between in situ brain permeability and brain free fraction. *J Pharmacol Exp Ther* 322, 205-213
- 16 Dehouck M. P. *et al.* (1990) An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 54, 1798-1801
- 17 Zhang Y. *et al.* (2006) Porcine brain microvessel endothelial cells as an in vitro model to predict in vivo blood-brain barrier permeability. *Drug Metab Dispos* 34, 1935-1943
- 18 Nakagawa S. *et al.* (2009) A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 54, 253-263
- 19 Coisne C. *et al.* (2005) Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest* 85, 734-746
- 20 Josserand V. *et al.* (2006) Evaluation of drug penetration into the brain: a double study by in vivo imaging with positron emission tomography and using an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 316, 79-86
- 21 Hamm S. *et al.* (2004) Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts. *Cell Tissue Res* 315, 157-166
- 22 Mysiorek C. *et al.* (2009) Peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha activation protects brain capillary endothelial cells from oxygen-glucose deprivation-induced hyperpermeability in the blood-brain barrier. *Curr Neurovasc Res* 6, 181-193
- 23 Lundquist S. *et al.* (2002) Prediction of drug transport through the blood-brain barrier in vivo: a comparison between two in vitro cell models. *Pharm Res* 19, 976-981
- 24 Culot M. *et al.* (2008) An in vitro blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol In Vitro* 22, 799-811
- 25 Berezowski V. *et al.* (2004) Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and

multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res* 1018, 1-9

26 Wan H. *et al.* (2007) High-throughput screening of drug-brain tissue binding and in silico prediction for assessment of central nervous system drug delivery. *J Med Chem* 50, 4606-4615

27 Yu Y. J. *et al.* (2011) Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Sci Transl Med* 3, 84ra44

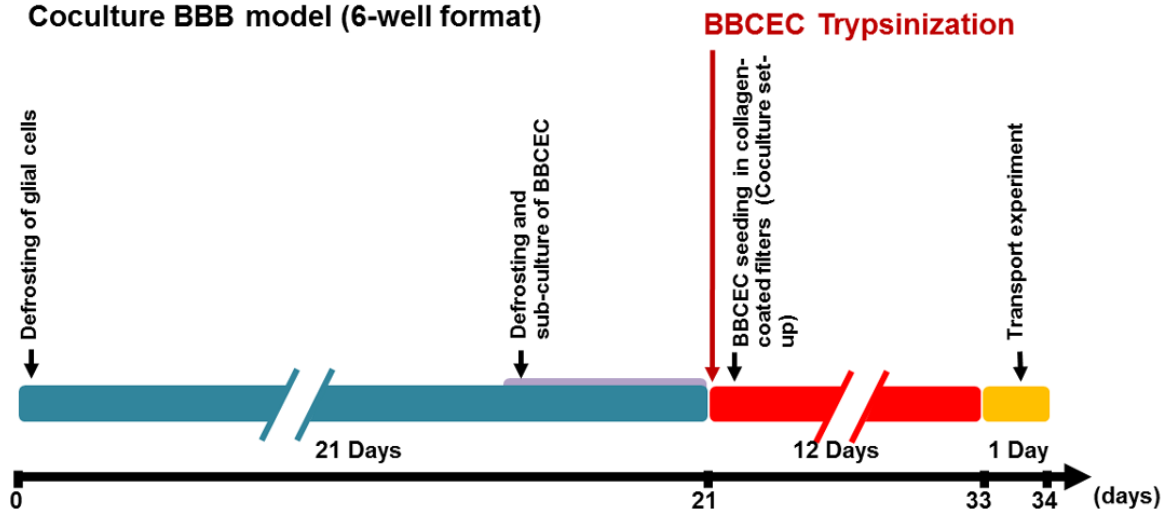
28 Levenberg S. *et al.* (2010) Isolation, differentiation and characterization of vascular

cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Protoc* 5, 1115-1126

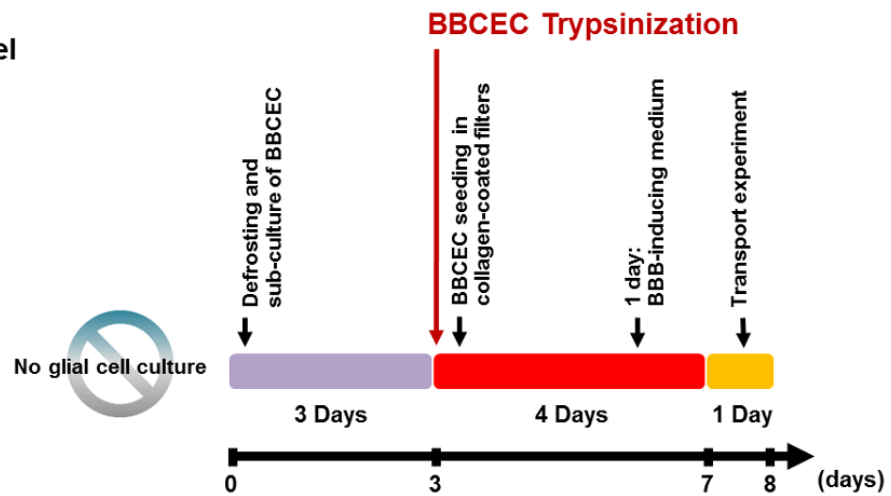
29 James D. *et al.* (2010) Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFbeta inhibition is Id1 dependent. *Nat Biotechnol* 28, 161-166

30 Asai Y. *et al.* (2010) Combination of functional cardiomyocytes derived from human stem cells and a highly-efficient microelectrode array system: an ideal hybrid model assay for drug development. *Curr Stem Cell Res Ther* 5, 227-232

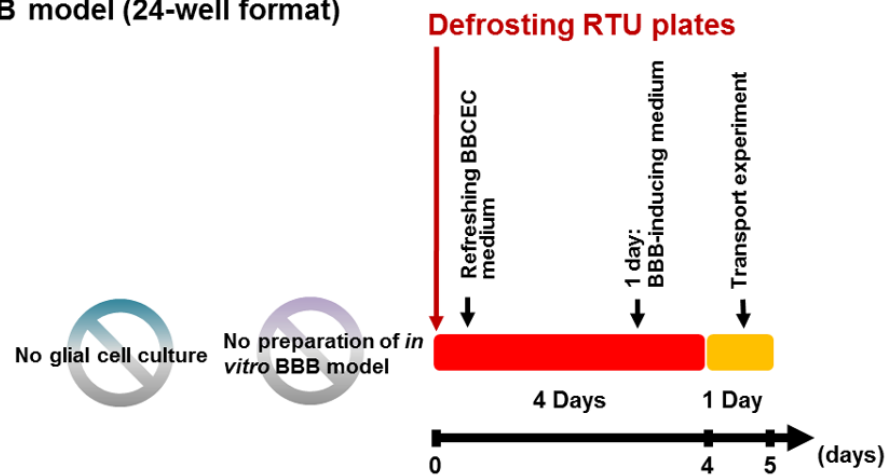
a. Coculture BBB model (6-well format)



b. 24-well BBB model



c. Ready-To-Use BBB model (24-well format)



- Glial cell culture
- Preparation of the *in vitro* BBB model
- Growing and differentiation period
- Analysis processing

Figure 1: The adaptation of *in vitro* blood-brain barrier (BBB) models for use in early-stage drug discovery.

a. The original co-culture model developed by Dehouck *et al.* [16] consists of bovine brain capillary ECs (BBCECs) cultured on a filter and glial cells cultured at the bottom of the well (the 6-well format). Setting up this system is time-consuming because glial cells require 3 weeks of culture and the subsequent co-culture of BBCECs and glial cells lasts for 12 days. The procedure features several delicate steps (BBCEC trypsinization and filter coating) but enables the reliable production of an *in vitro* BBB model with *in vivo* BBB features. The 6-well model is of value for studying the BBB under physiological and pathological conditions and takes account of endothelial and glial cell interactions.

b. A 24-well model was designed by simplifying the co-culture model for use in automated, high-throughput screening. The format was miniaturized (24 wells instead of 6), the glial cells were replaced by BBB-inducing medium and duration of cell culture was shortened (4 days instead of 12 days) [24]. The procedure still includes a trypsinization step and requires 3 days to prepare the model.

c. The ready-to-use (RTU) model was designed to be even more user-friendly because the critical trypsinisation step is avoided, therefore the final user does not need any specific technical training. The RTU *in vitro* BBB model is supplied in a frozen format and is ready for experimental use only 4 days after thawing and with only two medium changes.

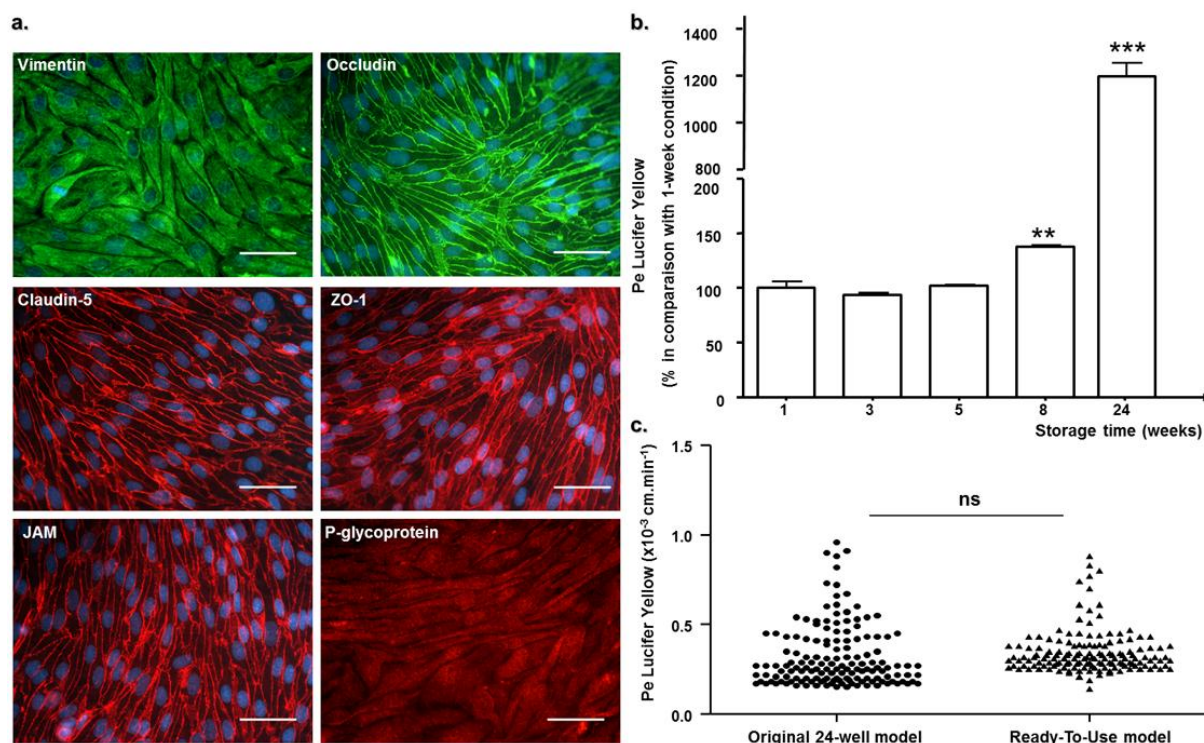


Figure 2: (a) Immunocytochemical characterization of the ready-to-use (RTU) blood-brain barrier (BBB) model. (b) The paracellular permeability of Lucifer Yellow across the endothelial monolayer as a function of storage time at -80°C. (c) A comparison with the original 24-well model.

a. The cell monolayer was immunostained to reveal an endothelial morphology (vimentin), the expression of tight junction proteins (occludin, claudin-5, zonula occludens-1 (ZO-1) and junctional adhesion molecule (JAM)) and the expression of P-glycoprotein. Scale bars: 100 μ m.

b. Effect of storage time at -80°C and delivery (48 hr in dry ice) on BBB integrity, as assessed by measuring the BBB's permeability (Pe) to the small, hydrophilic dye Lucifer Yellow (molecular mass: 457 g.mol $^{-1}$). Results are presented as the mean \pm SEM, $n = 12$ monolayers for all tests (except for the 8- and 24-week conditions, where $n=3$). Unpaired t-test: ** $p=0.082$, *** $p<0.001$.

c. Monolayer paracellular permeability (Pe, in cm.min $^{-1}$) was assessed by measuring the transport of Lucifer Yellow in the original 24-well model ($0.32 \pm 0.18 \times 10^{-3}$ cm.min $^{-1}$) and in the RTU model ($0.35 \pm 0.13 \times 10^{-3}$ cm.min $^{-1}$), as already described [24]. Results are presented as a scatter plot vertical representation for $n=147$ monolayers. Paired t-test; ns: non-significant, $p=0.19$.

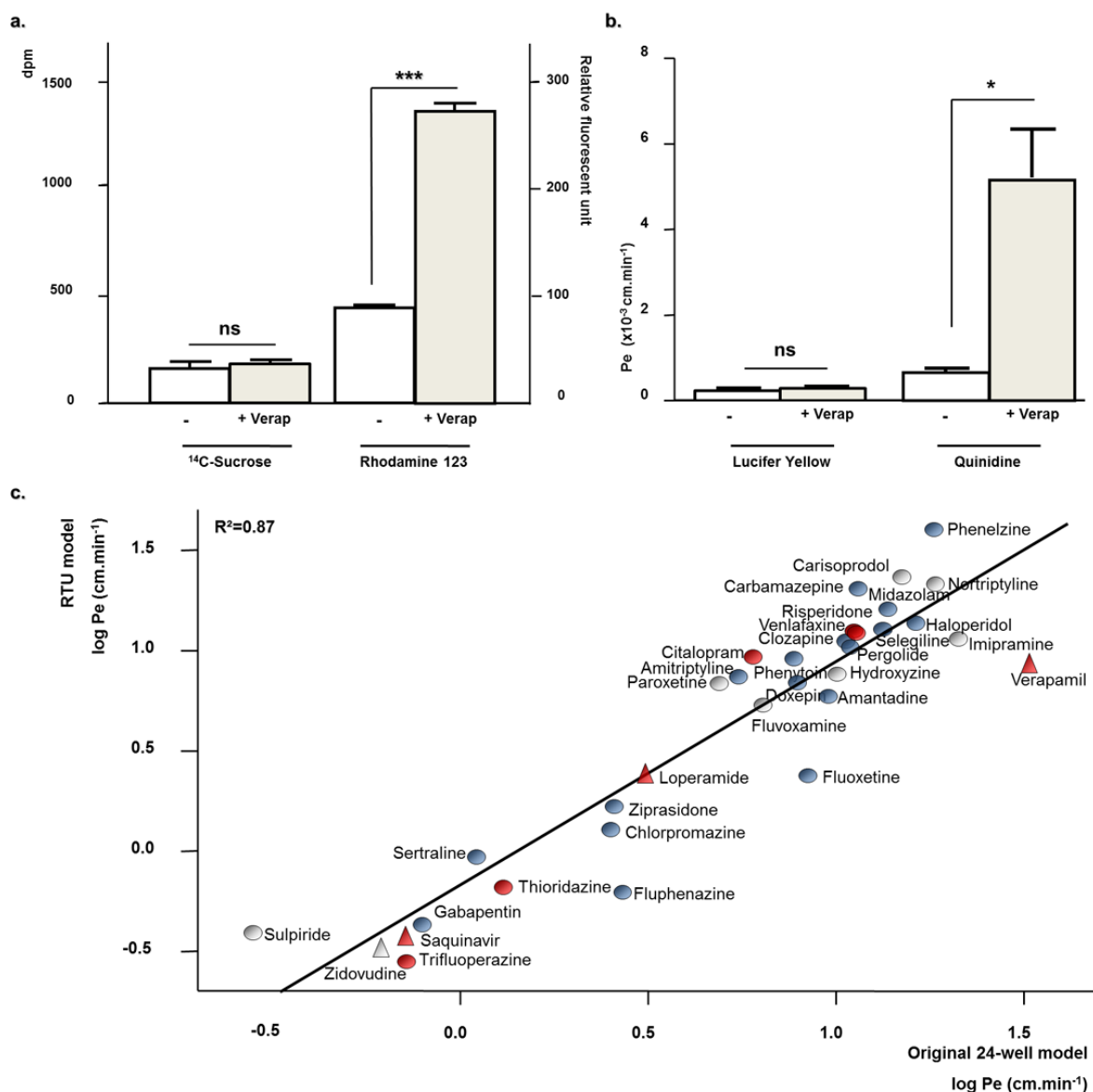


Figure 3: Assessment of efflux pump activity in the ready-to-use (RTU) blood-brain barrier (BBB) model. (a) Accumulation of rhodamine 123 in the presence and absence of verapamil. (b) Transport of quinidine in the presence and absence of verapamil. (c) The correlation between the permeability values of 33 compounds measured with the original 24-well model and the RTU model, respectively.

a. Efflux pump functionality was assessed by studying the accumulation of rhodamine 123 (R123) in endothelial cells (ECs) in the presence and absence of verapamil (Verap, 25 μ M). Verapamil increased R123 endothelial uptake more than 3-fold (273.2 ± 20.8 relative fluorescent units or RFUs vs 89.22 ± 6.4 RFUs for untreated cells). ¹⁴C-sucrose was co-incubated with R123 to confirm the absence of alterations in EC monolayer integrity and the absence of accumulation in the cells (164 ± 42.15 disintegrations per minute or dpm without verapamil vs 185.8 ± 29.59 dpm with verapamil). Results are expressed as the mean \pm SEM, n=3 monolayers for the sucrose assay and n=6 monolayers for the R123 assay. Unpaired t test; ns: non-significant, p=0.59; ***p<0.001.

b. Efflux pump functionality was also assessed by studying the transport of quinidine (10 μ M) across the BBB in the presence and absence of verapamil (Verap, 25 μ M). Verapamil increased quinidine transport 8-fold (endothelial permeability Pe of $5.16 \pm 1.24 \times 10^{-3}$ cm.min⁻¹ vs $0.66 \pm 0.09 \times 10^{-3}$ cm.min⁻¹ for untreated cells). Lucifer Yellow was co-incubated with quinidine to confirm the absence of alterations in EC monolayer integrity due to verapamil (Pe of $0.24 \pm 0.02 \times 10^{-3}$ cm.min⁻¹ vs $0.29 \pm 0.04 \times 10^{-3}$ cm.min⁻¹ for treated cells). Results are expressed as the mean \pm SEM, n=3 monolayers for the sucrose and quinidine assays. Unpaired t-test; ns: non-significant, p=0.26; *p<0.05.

c. Plot of permeability (Pe) values for 33 compounds measured in the original 24-well BBB model [24] and the RTU BBB model, n = 3 monolayers for each compound. CNS compounds are represented with circles and peripheral acting drugs with triangle. Known P-gp substrates are represented in red and compounds which are not P-gp substrates are in blue; the molecules for which this information is lacking or controversial are let in grey. All compounds were tested at 5 μ M, and their concentrations were determined by chromatography coupled with mass spectrometry. The correlation coefficient was $R^2 = 0.87$ and the slope differed significantly from zero, p<0.0001.

2.2 Discussion

L'avènement de la chimie combinatoire et de la robotique au sein des unités de recherche et développement des industries pharmaceutiques génèrent un très grand nombre de composés. Les molécules ciblant le SNC dont la pénétration cérébrale ne permettra pas d'atteindre la dose suffisante compatible avec leur activité thérapeutique doivent être identifiées le plus rapidement possible, évitant ainsi les risques d'échecs aux étapes plus avancées. L'étude *in vivo* de la pénétration cérébrale d'une molécule-candidate est coûteuse et nécessite l'utilisation d'animaux, et n'intervient donc en moyenne que 4 à 5 ans après sa sélection. En revanche, des modèles *in vitro* adéquates permettent l'évaluation de la perméabilité de la BHE pour un grand nombre de composés à moindre coût lors des étapes précoces.

Les lignées cellulaires d'origine non cérébrale telles que les cellules Caco-2 ont depuis longtemps leur place dans l'industrie pharmaceutique pour l'évaluation de l'absorption intestinale. Faciles à cultiver, elles sont aussi utilisées pour prédire le transport de médicaments à travers la BHE. Cependant, l'étude de [Lundquist et al. \(2002\)](#) démontre que les prédictions obtenues avec ces cellules sont moins fiables que celles obtenues avec notre modèle *in vitro* de BHE en coculture ([Dehouck et al., 1990](#)). De plus, leur architecture cellulaire et la composition de leur membrane plasmique sont différentes de celle des cellules endothéliales, suggérant qu'elle constituent des modèles assez éloignés de la BHE *in vivo* ([Di et al., 2009](#); [Lacombe et al., 2011](#)).

L'avantage des cellules endothéliales bovines, utilisées dans le modèle de coculture du laboratoire, réside dans le fait qu'elles peuvent être utilisées sur plusieurs générations et congelées, et donc utilisables à long terme. C'est une des raisons pour lesquelles ce modèle est effectivement utilisé par certaines firmes pharmaceutiques ([Mertsch et Maas, 2002](#)). Sa mise en place et son maintien nécessitent cependant une bonne connaissance de la culture des cellules endothéliales, l'extraction régulière de cellules gliales de rats nouveaux-nés, et une équipe doit donc être dédiée à cette tâche.

Puisque la culture primaire de cellules gliales constitue une étape à la fois longue (3 semaines de maintien) et laborieuse (dissection et isolement des cellules), il a été question de les remplacer par la lignée astrocytaire C6 ([Boveri et al., 2005](#)). Les résultats obtenus démontrent une différenciation insuffisante des cellules endothéliales en coculture par rapport à celle obtenue avec des cultures primaires de cellules gliales, ainsi qu'une sécrétion importante de VEGF par cette lignée, incompatible avec le maintien d'une faible perméabilité endothéliale.

Suite à ce premier essai infructueux, Culot *et al.* (2008) ont développé une stratégie alternative pour simplifier le modèle, en mettant à profit le milieu conditionné de coculture à la place des cellules gliales elles-mêmes, mais aussi en réduisant son format et le temps de culture total. En collaboration avec la société Cellial technologies (Lens, France), le « *BBB-inducing medium* » a été développé ; il contient du milieu conditionné de coculture et des séra sélectionnés. En réduisant l'utilisation des cellules gliales dans ce modèle, le nombre d'animaux utilisés dans ce cadre est donc diminué, en accord avec le principe des 3 Rs. La réduction du format 6 puits au format 24 puits a rendu ce modèle adaptable à la robotisation et donc au criblage à moyen ou haut débit de molécules.

Pour rendre encore plus aisée la mise en place de ce modèle, nous l'avons modifié afin qu'il soit prêt-à-l'emploi sous forme congelée. En effet, la procédure de mise en place du modèle de Culot *et al.* (2008) nécessite une étape de préparation du modèle où le manipulateur doit recouvrir les filtres de gel de collagène, décongeler les cellules endothéliales pour enfin les passer après confluence. Cette dernière manipulation est particulièrement critique et nécessite une formation car la qualité du modèle dépendra d'une « trypsinisation » parfaite des cellules endothéliales, c'est-à-dire de leur mise en suspension et dissociation rapide avant de les ensemercer dans les filtres. Pour éviter cet écueil, il nous a semblé opportun de réaliser cette étape nous-même pour que l'utilisateur final n'ait pas à manipuler les cellules endothéliales. Ainsi, l'ensemble comprenant la plaque de culture, les filtres et les cellules endothéliales tout juste ensemençées est congelé pour utilisation ultérieure. Le modèle obtenu est prêt à être utilisé 4 jours après décongélation, nécessitant uniquement deux renouvellements du milieu de culture avant l'expérience de transport.

Ce modèle, comme celui développé par Culot *et al.* (2008) à partir duquel il est adapté, présente les caractéristiques de la BHE et maintient ses propriétés restrictives jusqu'à 8 semaines de stockage à -80°C après sa livraison. L'étude du transport de 33 molécules aux propriétés variées a permis de démontrer une bonne corrélation entre ce modèle et celui de Culot *et al.* (2008).

Prêt-à-l'emploi car fourni congelé, l'utilisateur n'a pas besoin d'avoir de connaissances spécifiques pour utiliser ce modèle afin de déterminer rapidement la perméabilité de la BHE pour de nombreux composés à la fois. En évitant aux acteurs de l'industrie pharmaceutique de sous-traiter cette partie du travail, ce modèle leur permet de traiter les informations confidentielles correspondantes en interne.

Troisième partie

Discussion générale et conclusion

LES MALADIES du SNC, telles que les AVCs et la maladie d'Alzheimer, font partie des premières causes de handicap et de décès dans les pays industrialisés. Hormis la fibrinolyse pour le traitement aigu de l'AVC, dont la fenêtre thérapeutique est très réduite, la majorité des thérapies pharmacologiques modernes utilisées pour le traitement de ces pathologies ne font que réduire les symptômes, mais n'arrêtent pas la progression de la maladie et réduisent peu les déficits associés. D'ailleurs ces affections nécessitent une médication lourde et définitive, qui pourtant n'améliore pas de manière efficace la qualité de vie des patients concernés. Ces données suggèrent que les maladies affectant le SNC sont difficiles à traiter, et les options thérapeutiques apparaissent aujourd'hui limitées.

Importance de l'UNGV et de la BHE dans le maintien de l'homéostasie cérébrale

Une des explications plausibles au manque d'efficacité des thérapies proposées serait que les médicaments utilisés visent uniquement à améliorer les fonction neuronales, sans pour autant traiter les mécanismes sous-jacents des pathologies en question, ni tenir compte des autres types cellulaires concernés. Étant donné les nombreux échecs des agents neuroprotecteurs proposés jusqu'ici, les thérapies futures devront donc combiner des effets neuroprotecteurs et régénérateurs, pour permettre un effet durable de l'amélioration neurologique, et aussi prendre en compte l'ensemble de l'UNGV pour développer des traitements efficaces (Vangilder *et al.*, 2011) (Figure 37).

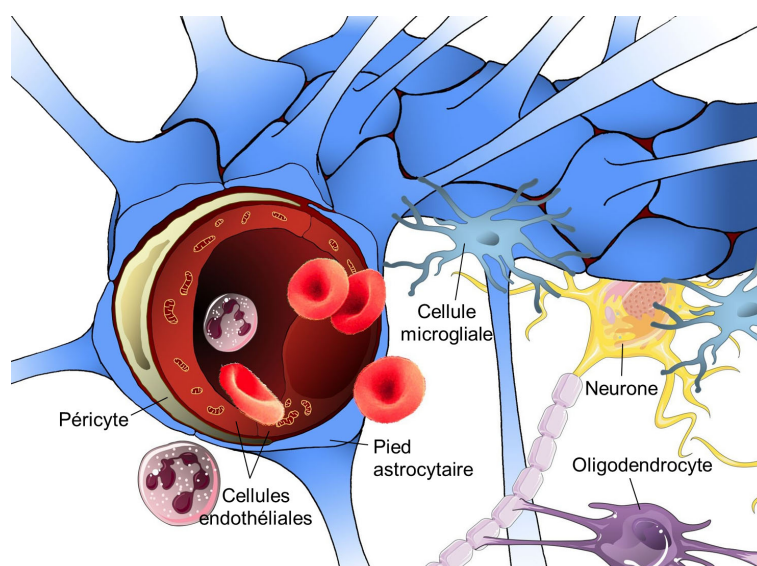


Figure 37 – L'unité neuro-glio-vasculaire.

En effet, toutes les cellules qui en font partie - les neurones bien sûr, mais également les cellules endothéliales de la BHE, les péricytes, les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie - travaillent de concert pour le maintien d'un environnement neuronal homéostatique (Hawkins et Davis, 2005). Dans ce cadre, une dérégulation des signalisations intra- et intercellulaires peut causer une dysfonction de l'UNGV, induisant ou aggravant une pathologie au niveau des cellules neuronales.

La BHE joue un rôle majeur au sein de l'UNGV : elle représente l'interface principale entre le sang et le parenchyme cérébral, régulant finement les échanges entre ces deux compartiments. Une altération des fonctions de la BHE est observée dans un grand nombre de pathologies affectant le SNC (Abbott *et al.*, 2010) : l'ischémie et les œdèmes cérébraux, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, l'épilepsie, les tumeurs cérébrales... Une perte ou une diminution de l'intégrité de la BHE a même pu être détectée avant l'apparition des dysfonctions neuronales dans certaines pathologies du SNC, telles que la sclérose en plaques (Katz *et al.*, 1993; Kermode *et al.*, 1990). Certains auteurs suggèrent qu'une dérégulation de la BHE soit à l'origine des maladies affectant les petits vaisseaux cérébraux (Wardlaw, 2010), sur la base d'études en imagerie chez l'Homme (Topakian *et al.*, 2010) et d'observations chez les modèles animaux correspondants (Bailey *et al.*, 2009). En outre, des données épidémiologiques et fondamentales démontrent que de nombreux facteurs de risque vasculaires sont associés à la maladie d'Alzheimer et influencent la cascade amyloïde, en relation avec des modifications de la clairance du peptide A β au niveau de la BHE (Altman et Rutledge, 2010; Zlokovic, 2008). La BHE est donc une structure-clé de l'UNGV dont la dysfonction peut induire ou modifier l'évolution des pathologies affectant le SNC, et constitue à ce titre une cible thérapeutique de choix.

Prendre en compte la BHE pour mettre au point des traitements efficaces contre les affections cérébrales semble donc nécessaire, mais nécessite tout d'abord une meilleure compréhension de son fonctionnement. Dans ce cadre les modèles *in vitro* de BHE ont un rôle à jouer, car ils facilitent l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires qui y sont impliqués, permettant de mieux appréhender le fonctionnement de la BHE dans les situations physiologiques et pathologiques. Ils représentent en outre une alternative à l'utilisation massive d'animaux à des fins expérimentales. Pour ce faire, ils doivent cependant reproduire fidèlement les caractéristiques de la BHE *in vivo*.

Utilisation des modèles *in vitro* pour l'étude de la BHE en conditions physiologiques et pathologiques

Notre modèle bovin en coculture a permis de comprendre l'effet inducteur des cellules gliales sur l'expression de récepteurs (Dehouck *et al.*, 1994) et de transporteurs d'efflux (Berezowski *et al.*, 2004; Fenart *et al.*, 1999) au niveau des cellules endothéliales de la BHE. Il a aussi été utile à l'étude des réponses de la BHE en conditions hypoxiques *in vitro*, révélant que l'ouverture précoce de la BHE observée dans ces conditions implique un mécanisme d'ouverture transcellulaire et dépend de la sécrétion de facteurs gliaux (Brillault *et al.*, 2002). À l'aide du même modèle, Culot *et al.* (2009) ont mis en évidence les effets protecteurs du NXY-059 sur les cellules endothéliales en conditions ischémiques, mimées *in vitro* par des conditions d'OGD. Un modèle syngénique murin développé au sein de notre laboratoire a permis l'identification des mécanismes d'action cellulaires et moléculaires du fénofibrate sur la BHE en conditions ischémiques, à l'aide de souris mutées pour le *peroxisome proliferator activated receptor- α* (PPAR- α) (Mysiorek *et al.*, 2009).

Ces données démontrent l'intérêt des modèles *in vitro* unissant cellules gliales et cellules endothéliales dans le cadre d'études mécanistiques cellulaires et moléculaires. Mais, étant donnée l'évolution récente des connaissances sur la BHE, il semble qu'une pièce manque au puzzle : les péricytes cérébraux, qui pourraient aussi constituer une cible thérapeutique visant à préserver la fonctionnalité de la BHE.

Dans ce cadre, nous avons donc étudié les propriétés des péricytes cérébraux *in vitro* puis les avons intégré au sein de notre modèle originel de coculture, afin de former des tricultures incluant cellules endothéliales, cellules gliales et péricytes cérébraux.

Les perspectives d'étude offertes par ces nouveaux modèles de BHE incluant les péricytes sont nombreuses :

- **Influence des péricytes sur le phénotype des cellules endothéliales.** Les résultats de notre étude ont suggéré que les péricytes avaient une faible influence sur l'expression transcriptionnelle des pompes d'efflux au niveau des cellules endothéliales en triculture, confirmant les études récemment menées *in vivo* par Armulik *et al.* (2010). Cependant, très peu d'informations ont été obtenues concernant l'expression protéique de ces mêmes transporteurs, il serait donc intéressant d'étudier cet aspect en comparant la condition de triculture sans contact avec la condition de coculture cellules endothéliales - cellules gliales, afin de confirmer les résultats obtenus au niveau

transcriptionnel. Pour cela, une étude comparative des profils protéiques endothéliaux dans ces deux conditions est envisageable.

Au-delà de ces pompes d'efflux, une analyse comparée des profils protéiques endothéliaux dans ces deux conditions pourrait nous permettre d'identifier des protéines exprimées différemment entre ces deux configurations, permettant d'identifier l'impact de la présence des péricytes sur le phénotype des cellules endothéliales.

- **Influence des cellules endothéliales sur le phénotype des péricytes.** Peu de données existent concernant l'influence des cellules endothéliales sur les péricytes (Ramsauer *et al.*, 1998). Il serait intéressant, notamment à l'aide de cocultures unissant ces deux types cellulaires, d'étudier l'effet de la coculture sur les péricytes, en terme de prolifération et de différenciation. Les différents marqueurs utilisés pour caractériser nos cultures de péricytes, qui ont été testés sur des péricytes cultivés seuls, pourraient être testés dans cette configuration et en triculture. Par exemple, l'expression de la P-gp au niveau des péricytes est-elle influencée par la présence de cellules endothéliales, et de cellules gliales ? Ces données donneraient une idée plus fine des interactions entre les différents types cellulaires.
- **Identification des facteurs impliqués dans les intercommunications cellulaires.** Notre modèle de triculture sans contact indique un effet hypoperméabilisant des péricytes, confirmant les résultats obtenus dans d'autres études en triculture (Nakagawa *et al.*, 2007) et en coculture cellules endothéliales-péricytes (Dohgu *et al.*, 2005). Les techniques de protéomique différentielle appliquées au sécrétome pourraient permettre d'identifier des facteurs sécrétés par les péricytes et potentiellement responsables de leur effet hypoperméabilisant au sein du modèle de triculture sans contact, ou en condition de coculture entre péricytes et cellules endothéliales. Les facteurs déjà identifiés dans ce cadre seront recherchés, tels que le TGF- β (Dohgu *et al.*, 2005; Hori *et al.*, 2004), et de nouveaux viendraient compléter la liste.

Ces nouveaux modèles *in vitro* pourront aussi servir à l'étude de la réponse des péricytes et de leur influence sur la BHE en conditions pathologiques :

- **L'ischémie cérébrale.** Des études menées *in vivo* (Duz *et al.*, 2007; Yemisci *et al.*, 2009) et *in vitro* (Al Ahmad *et al.*, 2009, 2011; Hayashi *et al.*, 2004) suggèrent que les péricytes sont sensibles aux stress hypoxiques et ischémiques, et influencent la réponse de l'endothélium dans

ces conditions. [Zozulya et al. \(2008\)](#) ont démontré que les péricytes stimulent la sécrétion de MMPs par les cellules endothéliales, qui pourraient être responsables d'une ouverture de la BHE, alors que d'autres auteurs ont pu démontrer un effet protecteur des péricytes en réduisant l'ouverture de la BHE suite à une hypoxie prolongée ([Al Ahmad et al., 2009](#)). Les modèles en triculture développés ici peuvent être utiles à une meilleure connaissance des événements ayant lieu au sein de la BHE en conditions ischémiques, mimées *in vitro* sous forme d'OGD.

- **La maladie d'Alzheimer.** L'implication des péricytes dans les maladies neurodégénératives, et en particulier dans la maladie d'Alzheimer, a été suggérée dans la littérature ([Bell et al., 2010](#); [Hamilton et al., 2010](#); [Quaegebeur et al., 2010](#); [Wilhelmus et al., 2007](#)). Des études préliminaires réalisées dans notre laboratoire démontrent que les péricytes expriment fortement le récepteur LRP1, qui est impliqué dans le transport du peptide A β ([Zlokovic et al., 2010](#)). Des expériences d'inhibition de ce récepteur permettront de clarifier son éventuelle contribution dans l'internalisation et dans la dégradation des peptides A β au niveau des péricytes cérébraux. De plus, l'implication des péricytes dans le métabolisme cérébral des peptides A β pourra être étudiée en utilisant les modèles en triculture présentés ici.
- **Les démences vasculaires : exemple du *cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy* (CADASIL).** Le CADASIL est une maladie autosomique rare et évolutive, causée par une mutation du gène Notch 3 ([Joutel et al., 1996](#)). Les symptômes les plus fréquemment observés incluent la survenue, après 40 ans, d'AVCs récidivants, pouvant apparaître même en l'absence de tout facteur de risque vasculaire. L'examen en microscopie électronique de biopsies cutanées, réalisées chez les sujets atteints de cette maladie, révèle l'altération des péricytes de la paroi des capillaires chez ces patients ; ces observations sont retrouvées de manière ubiquitaire dans tout le système vasculaire, mais les symptômes sont uniquement neurologiques. Ces données soulèvent la nécessité de clarifier le rôle des péricytes dans la potentielle dysfonction de la BHE dans cette pathologie ([Ruchoux et al., 2002](#)). Il existe un modèle murin de cette pathologie humaine : les souris mutées pour le gène Notch 3 ([Chabriat et al., 2009](#); [Joutel, 2011](#)), qui présentent des défauts vasculaires identiques à ceux observés chez l'Homme. L'utilisation de cellules issues de ces souris pour le développement d'une triculture syngénique murine pourrait permettre d'étudier plus finement les événements cellulaires et moléculaires mis en jeu dans cette pathologie.

Ces nouveaux modèles représentent donc l'unité glio-vasculaire dans son ensemble, ouvrant la voie à une meilleure compréhension des communications cellulaires ayant cours au sein de la BHE, en situations physiologiques ou pathologiques. Ce modèle viendra compléter le panel des rares modèles *in vitro* de BHE incluant les péricytes cérébraux en triculture (Hatherell *et al.*, 2011 ; Nakagawa *et al.*, 2009). Au-delà du fait qu'une dysfonction de la BHE puisse être impliquée dans le développement et/ou l'aggravation des symptômes dans certaines pathologies cérébrales, celle-ci empêche également un grand nombre de molécules thérapeutiques d'atteindre leurs cibles au niveau central.

La BHE, une structure limitante pour le traitement des affections cérébrales

Malgré les efforts déployés par l'industrie pharmaceutique ces dernières années, le nombre de composés mis sur le marché pour le traitement des maladies du SNC ne répond toujours pas à la demande (Jeffrey et Summerfield, 2010). Le taux d'échec très élevé des médicaments à visée cérébrale fait du traitement des pathologies du SNC l'un des domaines thérapeutiques les plus risqués à l'heure actuelle (Pangalos *et al.*, 2007).

Plusieurs raisons peuvent expliquer ce taux d'échec, comme une mauvaise appréhension des pathologies en question, ainsi que nous venons de le développer. Une autre explication peut être avancée : **les médicaments ont des difficultés à atteindre une concentration convenable au niveau du SNC pendant un temps suffisamment long pour permettre leur effet pharmacologique.** De nombreux facteurs déterminent la pénétration et la distribution cérébrales d'une molécule (Hammarlund-Udenaes *et al.*, 2008) : la liaison du composé aux protéines plasmatiques, aux hématies et au tissu cérébral, les modalités de son passage à travers la BHE, et sa distribution intracérébrale (Figure 38).

Dans le cadre des programmes de recherche et de développement de médicaments à cibles cérébrales, l'industrie pharmaceutique doit donc précocement prédire/déterminer la valeur des paramètres influençant la pénétration cérébrale des composés qu'elle produit. Pour cela, des outils variés de complexité croissante sont utilisés (investigations menées *in silico*, *in vitro* et *in vivo*) lors du processus de découverte et de développement de médicaments (Reichel, 2006, 2009).

Parmi les paramètres à prendre en compte se trouve la valeur de **perméabilité à travers la BHE**, qui indique la vitesse à laquelle le composé va la traverser. **Les propriétés restrictives de la BHE étant connues pour limiter le passage de nombreuses molécules du compartiment sanguin au**

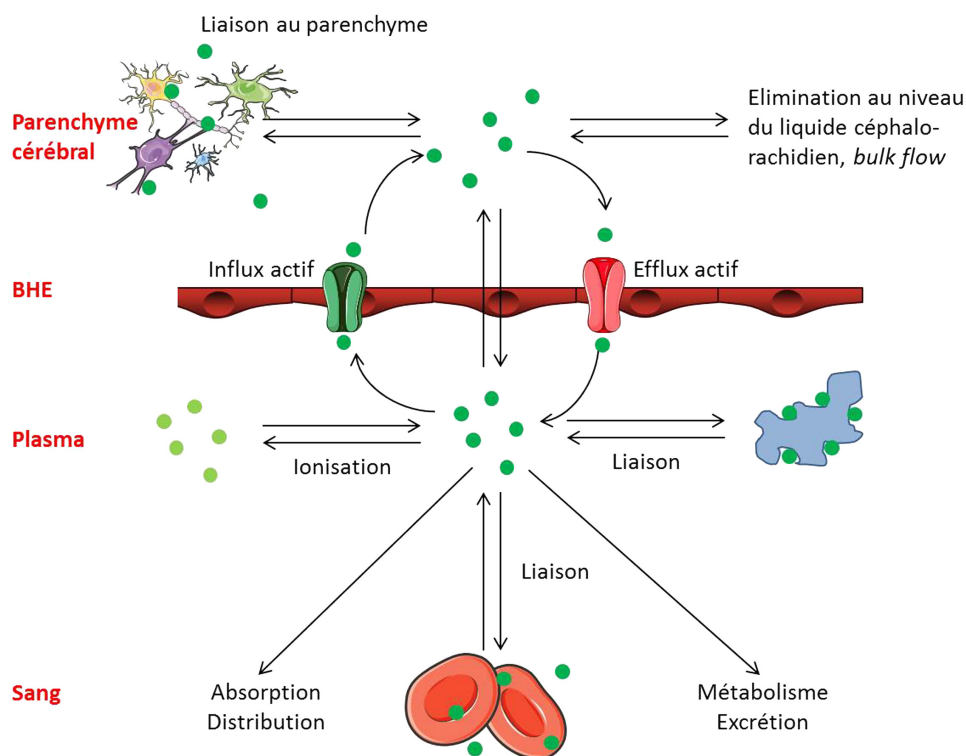


Figure 38 – Schéma indiquant différents facteurs influençant la pénétration cérébrale d'un médicament, sa distribution et son élimination du SNC. Modifié de Reichel (2009).

compartiment cérébral (Pardridge, 2005), l'industrie pharmaceutique traite ce problème dès les premières étapes du processus de découverte de médicaments. Ce paramètre est particulièrement important pour les médicaments qui doivent atteindre rapidement leur concentration optimale pour exercer leur effet pharmacologique, comme dans le traitement des crises d'épilepsie et des migraines. En effet la présence de jonctions serrées, l'expression de pompes d'efflux et d'enzymes métaboliques au niveau de la BHE peuvent considérablement limiter la pénétration cérébrale de nombreux composés ; à l'inverse, des mécanismes d'influx peuvent faciliter l'entrée de certains dans le parenchyme cérébral (Figure 38).

Utilisation des modèles *in vitro* pour l'étude du transport de molécules à travers la BHE

Pour étudier le transport de molécules à travers la BHE, l'industrie pharmaceutique utilise des modèles cellulaires *in vitro* qui, à l'instar des méthodes d'étude *in vivo*, sont utilisables très tôt dans le développement d'un médicament : elles sont en effet moins coûteuses et présentent un débit suffisant pour cribler le grand nombre de composés issus des programmes de recherche. Ces études *in vitro* font suite aux prédictions *in silico* utilisées en première intention, qui se basent uniquement sur

les propriétés physico-chimiques des molécules pour prédire leur perméabilité ; en revanche elles précèdent les études *in vivo*, plus lourdes, qui n'entrent en jeu que lorsque quelques médicaments-candidats ont été identifiés et sélectionnés. Parmi le grand nombre de modèles *in vitro* de BHE disponibles, et dont certains ont été brevetés (Tóth *et al.*, 2011), le choix des industriels est généralement le fruit d'un compromis entre une capacité de criblage importante et une bonne prédiction du passage des composés à travers la BHE *in vivo*. Leur facilité de culture a fait des lignées d'origine non cérébrale (telles que les cellules Caco-2 et MDCK) des outils intéressants pour l'évaluation de la perméabilité passive des composés. Cependant, leur architecture épithéliale et la composition de leur membrane plasmique diffèrent de celles des cellules endothéliales cérébrales remettant en question leur prédictibilité du passage de composés à travers la BHE *in vivo* (Di *et al.*, 2009; Lacombe *et al.*, 2011). Dans ce contexte, les modèles de coculture unissant des cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales et de cellules gliales sont reconnus comme reproduisant fidèlement la BHE *in vivo* (Cecchelli *et al.*, 2007), mais l'utilisation de cultures primaires limite sensiblement leur débit.

Dans ce cadre, comment augmenter le débit des modèles *in vitro* de BHE tout en conservant au mieux leur prédictibilité ?

Les lignées endothéliales mises au point jusqu'alors ne présentent pas une restriction suffisante de la voie paracellulaire pour être utiles à l'étude du transport de petites molécules, même si la facilité de culture constitue un avantage considérable. En revanche, il est possible de mettre à profit la capacité de certaines cellules endothéliales à être utilisables sur plusieurs générations, comme c'est le cas des cellules endothéliales cérébrales bovines et porcines. En outre, la possibilité de les congeler rend leur utilisation encore plus avantageuse, c'est pourquoi certaines firmes pharmaceutiques les intègrent au sein des modèles *in vitro* qu'elles utilisent. D'autres préfèrent tout de même sous-traiter cette partie du travail par des *spin-offs* ou des organismes de recherche sous contrat (Reichel, 2006).

Sur la base de ces observations et du modèle de coculture de notre laboratoire (Dehouck *et al.*, 1990), Culot *et al.* (2008) ont donc développé un modèle prédictif au format réduit, au temps de culture raccourci et au débit plus élevé, en adéquation avec les besoins inhérents au criblage massif de molécules.

Sur la base de ce premier effort, nous avons souhaité faciliter encore le travail des industriels en fournissant ce modèle congelé. La réalisation préalable des étapes délicates de mise en place du modèle (décongélation et ensemencement des cellules endothéliales notamment) font de lui un modèle prêt-à-l'emploi facile d'utilisation, même si l'utilisateur final a peu de connaissances de la culture

des cellules endothéliales cérébrales. C'est pourquoi ce modèle est aussi adapté aux petites sociétés de biotechnologie qui ne peuvent dédier une équipe spécialisée à cette tâche.

Ce modèle, simplifié dans sa structure, se présente donc comme un support intéressant des programmes de recherche au sein de l'industrie pharmaceutique, utile à l'évaluation précoce de la perméabilité des nombreux composés générés lors des premières phases de découverte de médicaments. En effet, il prend en compte l'architecture endothéliale et les caractéristiques de la BHE tout en étant adapté au criblage à moyen ou haut débit de molécules. L'utilisation de milieu conditionné à la place de cultures primaires de cellules gliales réduit considérablement l'utilisation d'animaux, en accord avec le principe des 3 Rs auquel l'industrie pharmaceutique veut se conformer. Il offre aussi aux sociétés la possibilité de traiter toutes les informations en interne, à l'instar des firmes qui sous-traitent cette partie et doivent donc coder les informations qu'elles ne veulent pas divulguer. L'effet des optimisations réalisées par les chimistes médicinaux sur les molécules d'intérêt concernant leur passage à travers la BHE peut rapidement être évalué. Ce modèle a donc sa place au sein de la batterie d'outils nécessaires à la prédiction à haut débit de la pénétration cérébrale des médicaments.

L'effet toxique aigu (voire chronique) de molécules vis-à-vis de la BHE peut également être étudié, pour l'industrie pharmaceutique et les instances réglementaires :

- **Toxicité aiguë.** Cette application concerne à la fois l'étude des mécanismes toxiques lors du développement de médicaments et l'entrée en vigueur de la réglementation REACH, relative à la sécurité des produits chimiques. En effet, ce modèle répond aux contraintes d'une utilisation à grande échelle nécessitant des réponses rapides concernant la toxicité de molécules. Dans le cadre du projet européen Acute-Tox (2005-2010), l'évaluation de la toxicité sur la BHE et du passage dans le compartiment cérébral de plusieurs composés potentiellement toxiques a été entreprise sur plusieurs modèle *in vitro* de BHE susceptibles d'être utilisés pour évaluer les composés concernés par l'entrée en vigueur de REACH en Europe. L'évaluation de la toxicité aiguë de 32 composés a été entreprise dans notre laboratoire ; des résultats très proches ont été obtenus entre le modèle originel de coculture (Dehouck *et al.*, 1990) et le modèle développé par Culot *et al.* (2008) pour les 32 composés dont la toxicité a été évaluée. Le modèle prêt-à-l'emploi décrit ici, qui se base sur ce dernier modèle, pourrait donc être utile à l'évaluation de la toxicité aiguë de molécules sur la BHE, après validation auprès de l'ECVAM. Ceci a été discuté lors de l'atelier « Modélisation

toxicocinétique » organisé conjointement par l'ECVAM et l'*European Partnership for Alternative Approaches to Animal testing* (EPAA) à Ispra (Italie) du 13 au 14 octobre 2011.

- **Toxicité chronique.** Puisque les effets néfastes de xénobiotiques peuvent ne se faire sentir qu'après une exposition répétée, il est nécessaire de prendre en compte cet aspect lors des études de toxicité sur la BHE. Cependant, ce type d'investigations nécessite que les modèles *in vitro* utilisés maintiennent leurs propriétés sur des temps longs. Ceux développés au sein de notre laboratoire pourront être utiles à l'évaluation de la toxicité de molécules vis-à-vis de la BHE en l'exposant *in vitro* à des doses répétées. Cette mise au point fait l'objet du projet européen *Predict IV* (FP7) débuté en 2008, qui vise à développer des stratégies alternatives à l'expérimentation *in vivo* pour l'évaluation rapide de l'innocuité des médicaments, à l'aide d'une combinaison de tests *in silico* et *in vitro*.

L'utilisation de ces modèles *in vitro* de BHE peut aussi être étendue à l'évaluation d'autres paramètres pharmacocinétiques impliqués dans la pénétration cérébrale des molécules, tels que le **ratio concentration libre cérébrale/concentration libre plasmatique**. Afin de favoriser la pénétration cérébrale d'un médicament à visée cérébrale, la stratégie longtemps adoptée par l'industrie pharmaceutique a consisté à optimiser leur passage à travers la BHE. Cette approche unilatérale a pu, selon certains auteurs, être responsable du taux d'échec élevé essuyé jusqu'ici par l'industrie pharmaceutique dans le développement de médicaments à visée cérébrale, reflétant une appréhension incomplète des processus influençant la pénétration cérébrale des médicaments. Au-delà de la valeur de perméabilité à travers la BHE, on sait aujourd'hui qu'il est aussi important de déterminer l'« **am-pleur** » de la **pénétration cérébrale à l'équilibre**, correspondant au ratio entre la concentrations que le médicament atteint dans le plasma et dans le compartiment cérébral à l'équilibre. Puisque seule la fraction non liée d'un composé est supposée pouvoir agir sur sa cible (Hammarlund-Udenaes *et al.*, 2008), il apparaît crucial de déterminer la concentration libre du composé à l'équilibre au niveau du parenchyme cérébral. La seule méthode *in vivo* permettant de déterminer cette concentration libre est la microdialyse intracérébrale, mais cette technique difficile à mettre en oeuvre ne convient pas aux étapes de criblage à haut débit de molécules.

Les modèles *in vitro* de BHE peuvent-ils être utilisés pour déterminer la concentration libre qu'atteindra une molécule au niveau du parenchyme cérébral, et pour prédire l'effet pharmacologique d'un composé pour une concentration libre plasmatique donnée ? Des études préliminaires ont été réalisées en collaboration avec la société AstraZeneca (Södertälje, Suède) à l'aide du modèle de co-

culture original (Sevin *et al.*, 2011). En réalisant une étude du passage de composés à travers la BHE en présence de cellules gliales en fonds de puits, il a été possible de déterminer le ratio concentration libre cérébrale/concentration libre plasmatique pour 148 composés, et de démontrer une bonne corrélation avec le ratio déterminé *in vivo*. Les résultats ont ainsi permis, en mettant en relation le ratio prédit *in vitro* et des données concernant l'exposition plasmatique des molécules, de prédire l'effet pharmacologique du composé selon la dose appliquée. Ces résultats prometteurs ouvrent la voie à l'adaptation de notre modèle original de coculture à de nouvelles applications en pharmacologie, permettant l'étude des différents paramètres impliqués dans la pénétration cérébrale des médicaments.

Conclusion

La modélisation *in vitro* constitue donc un outil puissant pour étudier la BHE, car les modèles cellulaires peuvent être adaptés à différents types d'application selon l'objectif poursuivi. Des modèles cellulaires reproduisant plus fidèlement l'environnement régnant *in vivo*, illustrés ici par les modèles en triculture, peuvent permettre l'étude des interactions cellulaires et moléculaires impliquées dans la mise en place de la BHE et dans son maintien en situations physiologiques et pathologiques. En tant que structure-clé dans la régulation des échanges entre le compartiment sanguin et le parenchyme cérébral, la BHE empêche un grand nombre de médicaments potentiels d'atteindre leur cible. Dans ce contexte, les modèles *in vitro* de BHE, comme le modèle prêt-à-l'emploi décrit ici, peuvent notamment permettre à l'industrie pharmaceutique de prédire et d'optimiser à grande échelle le passage de médicaments à travers la BHE, et d'étudier leur toxicité vis-à-vis d'elle.

Quatrième partie

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- AASMUNDSTAD, T. A., MORLAND, J. et PAULSEN, R. E. (1995). Distribution of morphine 6-glucuronide and morphine across the blood-brain barrier in awake, freely moving rats investigated by in vivo microdialysis sampling. *J Pharmacol Exp Ther*, 275(1):435–41.
- ABBOTT, N. J. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat*, 200(6):629–38.
- ABBOTT, N. J. (2004). Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Discovery Today : Technologies*, 1(4):407–416.
- ABBOTT, N. J., HUGHES, C. C., REVEST, P. A. et GREENWOOD, J. (1992). Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture : towards an in vitro blood-brain barrier. *J Cell Sci*, 103 (Pt 1):23–37.
- ABBOTT, N. J., PATABENDIGE, A. A., DOLMAN, D. E., YUSOF, S. R. et BEGLEY, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, 37(1):13–25.
- ABBOTT, N. J., RONNBACK, L. et HANSSON, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7(1):41–53.
- ABBRUSCATO, T. J., LOPEZ, S. P., MARK, K. S., HAWKINS, B. T. et DAVIS, T. P. (2002). Nicotine and cotinine modulate cerebral microvascular permeability and protein expression of ZO-1 through nicotinic acetylcholine receptors expressed on brain endothelial cells. *J Pharm Sci*, 91(12):2525–38.
- ABULROB, A., SPRONG, H., Van Bergen en HENEGOUWEN, P. et STANIMIROVIC, D. (2005). The blood-brain barrier transigrating single domain antibody : mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J Neurochem*, 95(4):1201–14.
- AL AHMAD, A., GASSMANN, M. et OGUNSHOLA, O. O. (2009). Maintaining blood-brain barrier integrity : pericytes perform better than astrocytes during prolonged oxygen deprivation. *J Cell Physiol*, 218(3):612–22.
- AL AHMAD, A., TABOADA, C. B., GASSMANN, M. et OGUNSHOLA, O. O. (2011). Astrocytes and pericytes differentially modulate blood-brain barrier characteristics during development and hypoxic insult. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(2):693–705.
- ALLSOPP, G. et GAMBLE, H. J. (1979). An electron microscopic study of the pericytes of the developing capillaries in human fetal brain and muscle. *J Anat*, 128(Pt 1):155–68.
- ALLT, G. et LAWRENSEN, J. G. (2001). Pericytes : cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs*, 169(1):1–11.
- ALTMAN, R. et RUTLEDGE, J. C. (2010). The vascular contribution to Alzheimer's disease. *Clin Sci (Lond)*, 119(10):407–21.
- AMBUDKAR, S. V., KIMCHI-SARFATY, C., SAUNA, Z. E. et GOTTESMAN, M. M. (2003). P-glycoprotein : from genomics to mechanism. *Oncogene*, 22(47):7468–85.
- AMIRY-MOGHADDAM, M., FRYDENLUND, D. S. et OTTERSEN, O. P. (2004). Anchoring of aquaporin-4 in brain : molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience*, 129(4):999–1010.
- ANDERSON, R. G., BROWN, M. S. et GOLDSTEIN, J. L. (1977). Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell*, 10(3):351–64.

- ANTONELLI-ORLIDGE, A., SAUNDERS, K. B., SMITH, S. R. et D'AMORE, P. A. (1989). An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(12):4544–8.
- ARMULIK, A., ABRAMSSON, A. et BETSHOLTZ, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, 97(6):512–23.
- ARMULIK, A., GENOVE, G. et BETSHOLTZ, C. (2011). Pericytes : developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, 21(2):193–215. 1878-1551 (Electronic) 1534-5807 (Linking) Journal Article.
- ARMULIK, A., GENOVE, G., MAE, M., NISANCIOGLU, M. H., WALLGARD, E., NIAUDET, C., HE, L., NORLIN, J., LINDBLOM, P., STRITTMATTER, K., JOHANSSON, B. R. et BETSHOLTZ, C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, 468(7323):557–61.
- ARONICA, E., GORTER, J. A., REDEKER, S., van VLIET, E. A., RAMKEMA, M., SCHEFFER, G. L., SCHEPPER, R. J., van der VALK, P., LEENSTRA, S., BAAYEN, J. C., SPLIT, W. G. et TROOST, D. (2005). Localization of breast cancer resistance protein (BCRP) in microvessel endothelium of human control and epileptic brain. *Epilepsia*, 46(6):849–57.
- ASABA, H., HOSOYA, K., TAKANAGA, H., OHTSUKI, S., TAMURA, E., TAKIZAWA, T. et TERASAKI, T. (2000). Blood-brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2. *J Neurochem*, 75(5):1907–16.
- BABAKHANIAN, K., BENDAYAN, M. et BENDAYAN, R. (2007). Localization of P-glycoprotein at the nuclear envelope of rat brain cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 361(2):301–6.
- BADAUT, J., LASBENNES, F., MAGISTRETTI, P. J. et REGLI, L. (2002). Aquaporins in brain : distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(4):367–78.
- BAILEY, E. L., MCCULLOCH, J., SUDLOW, C. et WARDLAW, J. M. (2009). Potential animal models of lacunar stroke : a systematic review. *Stroke*, 40(6):e451–8.
- BAKOS, E. et HOMOLYA, L. (2007). Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch*, 453(5):621–41.
- BAL-PRICE, A. K., HOGBERG, H. T., BUZANSKA, L. et COECKE, S. (2010). Relevance of in vitro neurotoxicity testing for regulatory requirements : challenges to be considered. *Neurotoxicol Teratol*, 32(1):36–41.
- BALABANOV, R. et DORE-DUFFY, P. (1998). Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res*, 53(6):637–44.
- BALABANOV, R., WASHINGTON, R., WAGNEROVA, J. et DORE-DUFFY, P. (1996). CNS microvascular pericytes express macrophage-like function, cell surface integrin alpha M, and macrophage marker ED-2. *Microvasc Res*, 52(2):127–42.
- BALIN, B. J., BROADWELL, R. D. et SALCMAN, M. (1987). Tubular profiles do not form transendothelial channels through the blood-brain barrier. *J Neurocytol*, 16(6):721–35.
- BANDOPADHYAY, R., ORTE, C., LAWRENSON, J. G., REID, A. R., DE SILVA, S. et ALLT, G. (2001). Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *J Neurocytol*, 30(1):35–44.
- BAUER, H. C. et BAUER, H. (2000). Neural induction of the blood-brain barrier : still an enigma. *Cell Mol Neurobiol*, 20(1):13–28.

- BAUER, H. C., BAUER, H., LAMETSCHWANDTNER, A., AMBERGER, A., RUIZ, P. et STEINER, M. (1993). Neovascularization and the appearance of morphological characteristics of the blood-brain barrier in the embryonic mouse central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*, 75(2):269–78.
- BAUER, H.-C., TRAWEGER, A. et BAUER, H. (2004). *Proteins of the tight junction in the blood-brain barrier*. Blood-spinal cord and brain barriers in health and disease. Elsevier, San Diego.
- BAZZONI, G. et DEJANA, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions : molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*, 84(3):869–901.
- BAZZONI, G., MARTINEZ-ESTRADA, O. M., ORSENIGO, F., CORDENONSI, M., CITI, S. et DEJANA, E. (2000). Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem*, 275(27):20520–6.
- BECK, D. W., ROBERTS, R. L. et OLSON, J. J. (1986). Glial cells influence membrane-associated enzyme activity at the blood-brain barrier. *Brain Res*, 381(1):131–7.
- BEGLEY, D. J. (2004). ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des*, 10(12):1295–312.
- BEGLEY, D. J. et BRIGHTMAN, M. W. (2003). Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res*, 61:39–78.
- BELINSKY, M. G., CHEN, Z. S., SHCHAVELEVA, I., ZENG, H. et KRUH, G. D. (2002). Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res*, 62(21):6172–7.
- BELL, R. D., WINKLER, E. A., SAGARE, A. P., SINGH, I., LARUE, B., DEANE, R. et ZLOKOVIC, B. V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron*, 68(3):409–27.
- BELL, R. D. et ZLOKOVIC, B. V. (2009). Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 118(1):103–13.
- BENDAYAN, R., RONALDSON, P. T., GINGRAS, D. et BENDAYAN, M. (2006). In situ localization of P-glycoprotein (ABCB1) in human and rat brain. *J Histochem Cytochem*, 54(10):1159–67.
- BEREZOWSKI, V., LANDRY, C., DEHOUCQ, M. P., CECCELLI, R. et FENART, L. (2004). Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res*, 1018(1):1–9.
- BERNAS, M. J., CARDOSO, F. L., DALEY, S. K., WEINAND, M. E., CAMPOS, A. R., FERREIRA, A. J., HOYING, J. B., WITTE, M. H., BRITES, D., PERSIDSKY, Y., RAMIREZ, S. H. et BRITO, M. A. (2010). Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an in vitro cellular model of the blood-brain barrier. *Nat Protoc*, 5(7):1265–72.
- BETZ, A. L., FIRTH, J. A. et GOLDSTEIN, G. W. (1980). Polarity of the blood-brain barrier : distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res*, 192(1):17–28.
- BICKEL, U. (2005). How to measure drug transport across the blood-brain barrier. *NeuroRx*, 2(1):15–26.
- BICKEL, U., YOSHIKAWA, T. et PARDRIDGE, W. M. (2001). Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, 46(1-3):247–79.
- BIEGEL, D., SPENCER, D. D. et PACTER, J. S. (1995). Isolation and culture of human brain microvessel endothelial cells for the study of blood-brain barrier properties in vitro. *Brain Res*, 692(1-2):183–9.

- BLACK, K. L., BABA, T. et PARDRIDGE, W. M. (1994). Enzymatic barrier protects brain capillaries from leukotriene C4. *J Neurosurg*, 81(5):745–51.
- BLASIG, I. E., GIESE, H., SCHROETER, M. L., SPORBERT, A., UTEPBERGENOV, D. I., BUCHWALOW, I. B., NEUBERT, K., SCHONFELDER, G., FREYER, D., SCHIMKE, I., SIEMS, W. E., PAUL, M., HASELOFF, R. F. et BLASIG, R. (2001). *NO and oxyradical metabolism in new cell lines of rat brain capillary endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Microvasc Res*, 62(2):114–27.
- BONKOWSKI, D., KATYSHEV, V., BALABANOV, R. D., BORISOV, A. et DORE-DUFFY, P. (2011). The CNS microvascular pericyte : pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids Barriers CNS*, 8(1):8.
- BORST, P., EVERS, R., KOOL, M. et WIJNHOLDS, J. (2000). A family of drug transporters : the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*, 92(16):1295–302.
- BORST, P. et SCHINKEL, A. H. (1997). Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *Trends Genet*, 13(6):217–22.
- BOUCHARD, B. A., SHATOS, M. A. et TRACY, P. B. (1997). Human brain pericytes differentially regulate expression of procoagulant enzyme complexes comprising the extrinsic pathway of blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(1):1–9.
- BOVERI, M., BEREZOWSKI, V., PRICE, A., SLUPEK, S., LENFANT, A. M., BENAUD, C., HARTUNG, T., CECHELLI, R., PRIETO, P. et DEHOUCK, M. P. (2005). Induction of blood-brain barrier properties in cultured brain capillary endothelial cells : comparison between primary glial cells and C6 cell line. *Glia*, 51(3):187–98.
- BOWMAN, P. D., BETZ, A. L., AR, D., WOLINSKY, J. S., PENNEY, J. B., SHIVERS, R. R. et GOLDSTEIN, G. W. (1981). Primary culture of capillary endothelium from rat brain. *In Vitro*, 17(4):353–62. 0073-5655 (Print) 0073-5655 (Linking) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- BOWMAN, P. D., ENNIS, S. R., RAREY, K. E., BETZ, A. L. et GOLDSTEIN, G. W. (1983). Brain microvessel endothelial cells in tissue culture : a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurol*, 14(4):396–402.
- BRADBURY, M. W. et KLEEMAN, C. R. (1967). Stability of the potassium content of cerebrospinal fluid and brain. *Am J Physiol*, 213(2):519–28.
- BRADBURY, M. W. et STULCOVA, B. (1970). Efflux mechanism contributing to the stability of the potassium concentration in cerebrospinal fluid. *J Physiol*, 208(2):415–30.
- BRENDEL, K., MEEZAN, E. et CARLSON, E. C. (1974). Isolated brain microvessels : a purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex. *Science*, 185(4155):953–5.
- BRIGHTMAN, M. W. et REESE, T. S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*, 40(3):648–77.
- BRILLAULT, J., BEREZOWSKI, V., CECHELLI, R. et DEHOUCK, M. P. (2002). Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. *J Neurochem*, 83(4):807–17.
- BRUNS, R. R. et PALADE, G. E. (1968). Studies on blood capillaries. II. Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries. *J Cell Biol*, 37(2):277–99.
- CANDELA, P., GOSSELET, F., MILLER, F., BUEE-SCHERRER, V., TORPIER, G., CECHELLI, R. et FENART, L. (2008). Physiological pathway for low-density lipoproteins across the blood-brain barrier : transcytosis through brain capillary endothelial cells in vitro. *Endothelium*, 15(5-6):254–64.

- CARL, S. M., LINDLEY, D. J., COURAUD, P. O., WEKSLER, B. B., ROMERO, I., MOWERY, S. A. et KNIPP, G. T. (2010). ABC and SLC transporter expression and pot substrate characterization across the human CMEC/D3 blood-brain barrier cell line. *Mol Pharm*, 7(4):1057–68.
- CARLSON, E. C. (1989). Fenestrated subendothelial basement membranes in human retinal capillaries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 30(9):1923–32.
- CAYROL, R., HAQQANI, A. S., IFERGAN, I., DODELET-DEVILLERS, A. et PRAT, A. (2011). Isolation of human brain endothelial cells and characterization of lipid raft-associated proteins by mass spectroscopy. *Methods Mol Biol*, 686:275–95.
- CECCHELLI, R., BEREZOWSKI, V., LUNDQUIST, S., CULOT, M., RENFTEL, M., DEHOUCK, M. P. et FENART, L. (2007). Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 6(8):650–61.
- CECCHELLI, R., COISNE, C., DEHOUCK, L., MILLER, F., DEHOUCK, M.-P., BUÉE-SCHERRER, V. et DEHOUCK, B. (2006). *Modeling the blood brain barrier*, volume 1 de *Blood-Brain Barriers : From Ontogeny to Artificial Interfaces*. Wiley-VCH, Weinheim.
- CECCHELLI, R., DEHOUCK, B., DESCAMPS, L., FENART, L., BUEE-SCHERRER, V. V., DUHEM, C., LUNDQUIST, S., RENTFEL, M., TORPIER, G. et DEHOUCK, M. P. (1999). In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, 36(2-3):165–178.
- CERLETTI, A., DREWE, J., FRICKER, G., EBERLE, A. N. et HUWYLER, J. (2000). Endocytosis and transcytosis of an immunoliposome-based brain drug delivery system. *J Drug Target*, 8(6):435–46.
- CESTELLI, A., CATANIA, C., D'AGOSTINO, S., DI LIEGRO, I., LICATA, L., SCHIERA, G., PITARRESI, G. L., SAVETTIERI, G., DE CARO, V., GIANDALIA, G. et GIANNOLA, L. I. (2001). Functional feature of a novel model of blood brain barrier : studies on permeation of test compounds. *J Control Release*, 76(1-2):139–47.
- CHABRIAT, H., JOUTEL, A., DICHGANS, M., TOURNIER-LASSERVE, E. et BOUSSER, M. G. (2009). Cadasil. *Lancet Neurol*, 8(7):643–53.
- CHI, J. T., CHANG, H. Y., HARALDSEN, G., JAHNSEN, F. L., TROYANSKAYA, O. G., CHANG, D. S., WANG, Z., ROCKSON, S. G., van de RIJN, M., BOTSTEIN, D. et BROWN, P. O. (2003). Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(19):10623–8.
- CISTERNINO, S., MERCIER, C., BOURASSET, F., ROUX, F. et SCHERRMANN, J. M. (2004). Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res*, 64(9):3296–301.
- CISTERNINO, S., ROUSSELLE, C., LORICO, A., RAPP, G. et SCHERRMANN, J. M. (2003). Apparent lack of Mrp1-mediated efflux at the luminal side of mouse blood-brain barrier endothelial cells. *Pharm Res*, 20(6):904–9.
- COECKE, S., GOLDBERG, A. M., ALLEN, S., BUZANSKA, L., CALAMANDREI, G., CROFTON, K., HARENG, L., HARTUNG, T., KNAUT, H., HONEGGER, P., JACOBS, M., LEIN, P., LI, A., MUNDY, W., OWEN, D., SCHNEIDER, S., SILBERGELD, E., REUM, T., TRNOVEC, T., MONNET-TSCHUDI, F. et BAL-PRICE, A. (2007). Workgroup report : incorporating in vitro alternative methods for developmental neurotoxicity into international hazard and risk assessment strategies. *Environ Health Perspect*, 115(6):924–31.
- COISNE, C., DEHOUCK, L., FAVEEUW, C., DELPLACE, Y., MILLER, F., LANDRY, C., MORISSETTE, C., FENART, L., CECCHELLI, R., TREMBLAY, P. et DEHOUCK, B. (2005). Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model : a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest*, 85(6):734–46.

- COLGAN, O. C., FERGUSON, G., COLLINS, N. T., MURPHY, R. P., MEADE, G., CAHILL, P. A. et CUMMINS, P. M. (2007). Regulation of bovine brain microvascular endothelial tight junction assembly and barrier function by laminar shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(6):H3190–7.
- COLLETT, G., WOOD, A., ALEXANDER, M. Y., VARNUM, B. C., BOOT-HANDFORD, R. P., OHANIAN, V., OHANIAN, J., FRIDELL, Y. W. et CANFIELD, A. E. (2003). Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. *Circ Res*, 92(10):1123–9.
- CORDENONSI, M., D'ATRI, F., HAMMAR, E., PARRY, D. A., KENDRICK-JONES, J., SHORE, D. et CITI, S. (1999). Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol*, 147(7):1569–82.
- CORDON-CARDO, C., O'BRIEN, J. P., CASALS, D., RITTMAN-GRAUER, L., BIEDLER, J. L., MELAMED, M. R. et BERTINO, J. R. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(2):695–8.
- CUCULLO, L., HOSSAIN, M., PUVENNA, V., MARCHI, N. et JANIGRO, D. (2011). The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci*, 12:40.
- CUEVAS, P., GUTIERREZ-DIAZ, J. A., REIMERS, D., DUJOVNY, M., DIAZ, F. G. et AUSMAN, J. I. (1984). Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries. *Anat Embryol (Berl)*, 170(2):155–9.
- CULOT, M., LUNDQUIST, S., VANUXEEM, D., NION, S., LANDRY, C., DELPLACE, Y., DEHOUC, M. P., BEREZOWSKI, V., FENART, L. et CECHELLI, R. (2008). An in vitro blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol In Vitro*, 22(3):799–811.
- CULOT, M., MYSIOREK, C., RENFTEL, M., ROUSSEL, B. D., HOMMET, Y., VIVIEN, D., CECHELLI, R., FENART, L., BEREZOWSKI, V., DEHOUC, M. P. et LUNDQUIST, S. (2009). Cerebrovascular protection as a possible mechanism for the protective effects of NXY-059 in preclinical models : an in vitro study. *Brain Res*, 1294:144–52.
- CZEREDYS, M., MYSIOREK, C., KULIKOVA, N., SAMLUK, L., BEREZOWSKI, V., CECHELLI, R. et NALECZ, K. A. (2008). A polarized localization of amino acid/carnitine transporter B(0,+)(ATB(0,+)) in the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun*, 376(2):267–70.
- DALKARA, T., GURSOY-OZDEMIR, Y. et YEMISCI, M. (2011). Brain microvascular pericytes in health and disease. *Acta Neuropathol*, 122(1):1–9.
- DANEMAN, R., ZHOU, L., KEBEDE, A. A. et BARRES, B. A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323):562–6.
- DAUCHY, S., DUTHEIL, F., WEAVER, R. J., CHASSOUX, F., DAUMAS-DUPORT, C., COURAUD, P. O., SCHERRMANN, J. M., DE WAZIERS, I. et DECLEVES, X. (2008). ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors : expression at the human blood-brain barrier. *J Neurochem*, 107(6):1518–28.
- DAUCHY, S., MILLER, F., COURAUD, P. O., WEAVER, R. J., WEKSLER, B., ROMERO, I. A., SCHERRMANN, J. M., DE WAZIERS, I. et DECLEVES, X. (2009). Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol*, 77(5):897–909.
- DAVSON, H. et OLDENDORF, W. H. (1967). Symposium on membrane transport. Transport in the central nervous system. *Proc R Soc Med*, 60(4):326–9.
- de VRIES, N. A., ZHAO, J., KROON, E., BUCKLE, T., BEIJNEN, J. H. et van TELLINGEN, O. (2007). P-glycoprotein and breast cancer resistance protein : two dominant transporters working together in limiting the brain penetration of topotecan. *Clin Cancer Res*, 13(21):6440–9.

- DEANE, R., WU, Z. et ZLOKOVIC, B. V. (2004). RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke*, 35(11 Suppl 1): 2628–31.
- DEBAULT, L. E. (1981). gamma-Glutamyltranspeptidase induction mediated by glial foot process-to endothelium contact in co-culture. *Brain Res*, 220(2):432–5.
- DEBAULT, L. E. et CANCELLA, P. A. (1980). gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells : induction by glial cells in vitro. *Science*, 207(4431):653–5. 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- DECLEVES, X., REGINA, A., LAPLANCHE, J. L., ROUX, F., BOVAL, B., LAUNAY, J. M. et SCHERRMANN, J. M. (2000). Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res*, 60(5):594–601.
- DECLÈVES, X., JACOB, A., YOUSIF, S., SHAWAHNA, R., POTIN, S. et SCHERRMANN, J. M. (2011). Interplay of Drug Metabolizing CYP450 Enzymes and ABC Transporters in the Blood-Brain Barrier. *Curr Drug Metab*. 1875-5453 (Electronic) 1389-2002 (Linking) Journal article.
- DEHOUCK, B., DEHOUCK, M. P., FRUCHART, J. C. et CECHELLI, R. (1994). Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier : intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol*, 126(2):465–73.
- DEHOUCK, M. P., MÉRESSE, S., DELORME, P., FRUCHART, J. C. et CECHELLI, R. (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem*, 54(5): 1798–801.
- DEHOUCK, M.-P., VANDENHAUTE, E., DEHOUCK, L., SEVIN, E., LENFANT, A.-M., DELPLACE, Y., HALLIER-VANUXEEM, D., CULOT, M. et CECHELLI, R. (2011). Modelling the Blood–Brain Barrier. 56:145–160.
- DEHOUCK, M. P., VIGNE, P., TORPIER, G., BREITTMAYER, J. P., CECHELLI, R. et FRELIN, C. (1997). Endothelin-1 as a mediator of endothelial cell-pericyte interactions in bovine brain capillaries. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17(4):464–9.
- DEJANA, E. (2004). Endothelial cell-cell junctions : happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(4):261–70.
- DEJANA, E., CORADA, M. et LAMPUGNANI, M. G. (1995). Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J*, 9(10):910–8.
- DELI, M. A., ABRAHAM, C. S., KATAOKA, Y. et NIWA, M. (2005). Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models : physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*, 25(1):59–127.
- DELI, M. A., ABRAHAM, C. S., NIWA, M. et FALUS, A. (2003). N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine increases the permeability of primary mouse cerebral endothelial cell monolayers. *Inflamm Res*, 52 Suppl 1:S39–40.
- DELORME, P., GRIGNON, G. et GAYET, J. (1968). [Ultrastructure of the capillaries in the telencephalon of the chicken during embryogenesis and postnatal growth]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 87(4):592–602.
- DESCAMPS, L., DEHOUCK, M. P., TORPIER, G. et CECHELLI, R. (1996). Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am J Physiol*, 270(4 Pt 2):H1149–58.
- DI, L., KERNS, E. H., BEZAR, I. F., PETUSKY, S. L. et HUANG, Y. (2009). Comparison of blood-brain barrier permeability assays : in situ brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *J Pharm Sci*, 98(6):1980–91.

- DI, L., KERNS, E. H., FAN, K., MCCONNELL, O. J. et CARTER, G. T. (2003). High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur J Med Chem*, 38(3):223–32.
- DIAZ-FLORES, L., GUTIERREZ, R., MADRID, J. F., VARELA, H., VALLADARES, F., ACOSTA, E., MARTIN-VASALLO, P. et DIAZ-FLORES, L., J. (2009). Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol*, 24(7):909–69.
- DIGLIO, C. A., GRAMMAS, P., GIACOMELLI, F. et WIENER, J. (1982). Primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells. Isolation, growth, and characterization. *Lab Invest*, 46(6):554–63.
- DODGE, A. B., HECHTMAN, H. B. et SHEPRO, D. (1991). Microvascular endothelial-derived autacoids regulate pericyte contractility. *Cell Motil Cytoskeleton*, 18(3):180–8.
- DOHGU, S., TAKATA, F., YAMAUCHI, A., NAKAGAWA, S., EGAWA, T., NAITO, M., TSURUO, T., SAWADA, Y., NIWA, M. et KATAOKA, Y. (2005). Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res*, 1038(2):208–15.
- DORE-DUFFY, P. (2008). Pericytes : pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des*, 14(16):1581–93.
- DORE-DUFFY, P. et CLEARY, K. (2011). Morphology and properties of pericytes. *Methods Mol Biol*, 686:49–68.
- DORE-DUFFY, P., KATYCHEV, A., WANG, X. et VAN BUREN, E. (2006). CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(5):613–24.
- DORE-DUFFY, P., OWEN, C., BALABANOV, R., MURPHY, S., BEAUMONT, T. et RAFOLS, J. A. (2000). Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury. *Microvasc Res*, 60(1):55–69.
- DORE-DUFFY, P., WANG, S., MEHEDI, A., KATYSHEV, V., CLEARY, K., TAPPER, A., REYNOLDS, C., DING, Y., ZHAN, P., RAFOLS, J. et KREIPKE, C. W. (2011). Pericyte-mediated vasoconstriction underlies TBI-induced hypoperfusion. *Neurol Res*, 33(2):176–86. 1743-1328 (Electronic) 0161-6412 (Linking) Journal Article.
- DOROVINI-ZIS, K., PRAMEYA, R. et BOWMAN, P. D. (1991). Culture and characterization of microvascular endothelial cells derived from human brain. *Lab Invest*, 64(3):425–36.
- dos SANTOS, A. P., MILATOVIC, D., AU, C., YIN, Z., BATOREU, M. C. et ASCHNER, M. (2010). Rat brain endothelial cells are a target of manganese toxicity. *Brain Res*, 1326:152–61.
- DOYLE, L. A., YANG, W., ABRUZZO, L. V., KROGMANN, T., GAO, Y., RISHI, A. K. et ROSS, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(26):15665–70.
- DUPORT, S., ROBERT, F., MULLER, D., GRAU, G., PARISI, L. et STOPPINI, L. (1998). An in vitro blood-brain barrier model : cocultures between endothelial cells and organotypic brain slice cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(4):1840–5.
- DURIEU-TRAUTMANN, O., FOIGNANT-CHAUVEROT, N., PERDOMO, J., GOUNON, P., STROSBERG, A. D. et COURAUD, P. O. (1991). Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium. *In Vitro Cell Dev Biol*, 27A(10):771–8.
- DUZ, B., OZTAS, E., ERGINAY, T., ERDOGAN, E. et GONUL, E. (2007). The effect of moderate hypothermia in acute ischemic stroke on pericyte migration : an ultrastructural study. *Cryobiology*, 55(3):279–84.
- EBNET, K., SUZUKI, A., OHNO, S. et VESTWEBER, D. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs) : more molecules with dual functions ? *J Cell Sci*, 117(Pt 1):19–29.

- ECKER, G. et NOE, C. (2006). *In Silico Prediction Models for Blood-Brain Barrier Permeation*, volume 1 de *Blood-Brain Barriers : From Ontogeny to Artificial Interfaces*. Wiley-VCH, Weinheim.
- EHRlich, P. (1885). Das Sauerstoff-Beduerfnis des Organismus : Eine Farbenanalytische Studie. 8:167.
- EISENBLÄTTER, T., HUWEL, S. et GALLA, H. J. (2003). Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Res*, 971(2):221–31.
- ENGELHARDT, B. (2006). *Development of the Blood-Brain Interface*. , volume 1 de *Blood-Brain Barriers : From Ontogeny to Artificial Interfaces*. Wile-VCH, Weinheim.
- ENGELHARDT, B. et SOROKIN, L. (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers : function and dysfunction. *Semin Immunopathol*, 31(4):497–511.
- FABRY, Z., FITZSIMMONS, K. M., HERLEIN, J. A., MONINGER, T. O., DOBBS, M. B. et HART, M. N. (1993a). Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes. *J Neuroimmunol*, 47(1):23–34.
- FABRY, Z., SANDOR, M., GAJEWSKI, T. F., HERLEIN, J. A., WALDSCHMIDT, M. M., LYNCH, R. G. et HART, M. N. (1993b). Differential activation of Th1 and Th2 CD4+ cells by murine brain microvessel endothelial cells and smooth muscle/pericytes. *J Immunol*, 151(1):38–47.
- FARIA, A., PESTANA, D., TEIXEIRA, D., AZEVEDO, J., DE FREITAS, V., MATEUS, N. et CALHAU, C. (2010). Flavonoid transport across RBE4 cells : A blood-brain barrier model. *Cell Mol Biol Lett*, 15(2):234–41.
- FARRELL, C. R., STEWART, P. A., FARRELL, C. L. et DEL MAESTRO, R. F. (1987). Pericytes in human cerebral microvasculature. *Anat Rec*, 218(4):466–9.
- FARRINGTON-ROCK, C., CROFTS, N. J., DOHERTY, M. J., ASHTON, B. A., GRIFFIN-JONES, C. et CANFIELD, A. E. (2004). Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation*, 110(15):2226–32.
- FAZAKAS, C., WILHELM, I., NAGYOSZI, P., FARKAS, A. E., HASKO, J., MOLNAR, J., BAUER, H., BAUER, H. C., AYAYDIN, F., DUNG, N. T., SIKLOS, L. et KRIZBAI, I. A. (2011). Transmigration of Melanoma Cells through the Blood-Brain Barrier : Role of Endothelial Tight Junctions and Melanoma-Released Serine Proteases. *PLoS One*, 6(6):e20758.
- FENART, L., BUEE-SCHERRER, V., DESCAMPS, L., DUHEM, C., POULLAIN, M. G., CECCHELLI, R. et DEHOUC, M. P. (1998). Inhibition of P-glycoprotein : rapid assessment of its implication in blood-brain barrier integrity and drug transport to the brain by an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharm Res*, 15(7):993–1000.
- FENART, L., CASANOVA, A., DEHOUC, B., DUHEM, C., SLUPEK, S., CECCHELLI, R. et BETBEDER, D. (1999). Evaluation of effect of charge and lipid coating on ability of 60-nm nanoparticles to cross an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther*, 291(3):1017–22.
- FENART, L. et CECCHELLI, R. (2003). Protein transport in cerebral endothelium. In vitro transcytosis of transferrin. *Methods Mol Med*, 89:277–90.
- FENSTERMACHER, J., GROSS, P., SPOSITO, N., ACUFF, V., PETTERSEN, S. et GRUBER, K. (1988). Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann N Y Acad Sci*, 529:21–30.
- FERNANDEZ-KLETT, F., OFFENHAUSER, N., DIRNAGL, U., PRILLER, J. et LINDAUER, U. (2010). Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(51):22290–5.

- FISCHER, S., NISHIO, M., PETERS, S. C., TSCHERNATSCH, M., WALBERER, M., WEIDEMANN, S., HEIDENREICH, R., COURAUD, P. O., WEKSLER, B. B., ROMERO, I. A., GERRIETS, T. et PREISSNER, K. T. (2009). Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells. *Faseb J*, 23(7):2100–9.
- FISCHER, S., WOBGEN, M., MARTI, H. H., RENZ, D. et SCHAPER, W. (2002). Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1. *Microvasc Res*, 63(1):70–80.
- FISHMAN, J. B., RUBIN, J. B., HANDRAHAN, J. V., CONNOR, J. R. et FINE, R. E. (1987). Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood-brain barrier. *J Neurosci Res*, 18(2):299–304.
- FLETCHER, N. F., BRAYDEN, D. J., BRANKIN, B., WORRALL, S. et CALLANAN, J. J. (2006). Growth and characterisation of a cell culture model of the feline blood-brain barrier. *Vet Immunol Immunopathol*, 109(3-4):233–44.
- FRANCESCA, B. et REZZANI, R. (2010). Aquaporin and blood brain barrier. *Curr Neuroparmacol*, 8(2):92–6.
- FRANKE, H., GALLA, H. et BEUCKMANN, C. T. (2000). Primary cultures of brain microvessel endothelial cells : a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res Brain Res Protoc*, 5(3):248–56.
- FREY, A., MECKELEIN, B., WEILER-GUTTNER, H., MOCKEL, B., FLACH, R. et GASSEN, H. G. (1991). Pericytes of the brain microvasculature express gamma-glutamyl transpeptidase. *Eur J Biochem*, 202(2):421–9.
- FRIDEN, M., GUPTA, A., ANTONSSON, M., BREDBERG, U. et HAMMARLUND-UDENAES, M. (2007). In vitro methods for estimating unbound drug concentrations in the brain interstitial and intracellular fluids. *Drug Metab Dispos*, 35(9):1711–9.
- FRIDEN, P. M., WALUS, L. R., WATSON, P., DOCTROW, S. R., KOZARICH, J. W., BACKMAN, C., BERGMAN, H., HOFFER, B., BLOOM, F. et GRANHOLM, A. C. (1993). Blood-brain barrier penetration and in vivo activity of an NGF conjugate. *Science*, 259(5093):373–7.
- FUJIMOTO, K. (1995). Pericyte-endothelial gap junctions in developing rat cerebral capillaries : a fine structural study. *Anat Rec*, 242(4):562–5.
- FURUSE, M. (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(1):a002907.
- FURUSE, M., HIRASE, T., ITOH, M., NAGAFUCHI, A., YONEMURA, S., TSUKITA, S. et TSUKITA, S. (1993). Occludin : a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, 123(6 Pt 2):1777–88.
- GABATHULER, R. (2010). Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol Dis*, 37(1):48–57.
- GAENGEL, K., GENOVE, G., ARMULIK, A. et BETSHOLTZ, C. (2009). Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(5):630–8.
- GAILLARD, P. J., van der SANDT, I. C., VOORWINDEN, L. H., VU, D., NIELSEN, J. L., de BOER, A. G. et BREIMER, D. D. (2000). Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharm Res*, 17(10):1198–205.
- GAO, B., HAGENBUCH, B., KULLAK-UBLUCK, G. A., BENKE, D., AGUZZI, A. et MEIER, P. J. (2000). Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther*, 294(1):73–9.

- GAO, B., STIEGER, B., NOE, B., FRITSCHY, J. M. et MEIER, P. J. (1999). Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain. *J Histochem Cytochem*, 47(10):1255–64.
- GARCIA, C. M., DARLAND, D. C., MASSINGHAM, L. J. et D'AMORE, P. A. (2004). Endothelial cell-astrocyte interactions and TGF beta are required for induction of blood-neural barrier properties. *Brain Res Dev Brain Res*, 152(1):25–38.
- GASCHE, Y., SOCCAL, P. M., KANEMITSU, M. et COPIN, J. C. (2006). Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front Biosci*, 11:1289–301.
- GENTIL, B. J., BENAUD, C., DELPHIN, C., REMY, C., BEREZOWSKI, V., CECCELLI, R., FERAUD, O., VITTET, D. et BAUDIER, J. (2005). Specific AHNAK expression in brain endothelial cells with barrier properties. *J Cell Physiol*, 203(2):362–71.
- GERHARDT, H. et BETSHOLTZ, C. (2003). Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*, 314(1):15–23.
- GHERSI-EGEA, J. F., LEININGER-MULLER, B., CECCELLI, R. et FENSTERMACHER, J. D. (1995). Blood-brain interfaces : relevance to cerebral drug metabolism. *Toxicol Lett*, 82-83:645–53.
- GOETZ, I. E., WARREN, J., ESTRADA, C., ROBERTS, E. et KRAUSE, D. N. (1985). Long-term serial cultivation of arterial and capillary endothelium from adult bovine brain. *In Vitro Cell Dev Biol*, 21(3 Pt 1):172–80.
- GOLDEN, P. L. et PARDRIDGE, W. M. (1999). P-Glycoprotein on astrocyte foot processes of unfixed isolated human brain capillaries. *Brain Res*, 819(1-2):143–6.
- GOLDEN, P. L. et PARDRIDGE, W. M. (2000). Brain microvascular P-glycoprotein and a revised model of multidrug resistance in brain. *Cell Mol Neurobiol*, 20(2):165–81.
- GOLDMANN, E. (1913). Vitalfärbung am Zentralnervensystem. *Abh. Preuss. Akad. Wiss. Phys. Math.*, K1(1):1–60.
- GONZÁLEZ-MARISCAL, L., BETANZOS, A., NAVA, P. et JARAMILLO, B. E. (2003). Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 81(1):1–44.
- GONZÁLEZ-MARISCAL, L., TAPIA, R. et CHAMORRO, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1778(3):729–56.
- GOODWIN, J. T. et CLARK, D. E. (2005). In silico predictions of blood-brain barrier penetration : considerations to "keep in mind". *J Pharmacol Exp Ther*, 315(2):477–83.
- GOSSELET, F., CANDELA, P., SEVIN, E., BEREZOWSKI, V., CECCELLI, R. et FENART, L. (2009). Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier : use of an in vitro model. *Brain Res*, 1249:34–42.
- GOTTARDI, C. J., ARPIN, M., FANNING, A. S. et LOUVARD, D. (1996). The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(20):10779–84.
- GRATTON, J. A., ABRAHAM, M. H., BRADBURY, M. W. et CHADHA, H. S. (1997). Molecular factors influencing drug transfer across the blood-brain barrier. *J Pharm Pharmacol*, 49(12):1211–6.
- GREENE, N., JUDSON, P. N., LANGOWSKI, J. J. et MARCHANT, C. A. (1999). Knowledge-based expert systems for toxicity and metabolism prediction : DEREK, StAR and METEOR. *SAR QSAR Environ Res*, 10(2-3):299–314.

- GREENWOOD, J., PRYCE, G., DEVINE, L., MALE, D. K., dos SANTOS, W. L., CALDER, V. L. et ADAMSON, P. (1996). SV40 large T immortalised cell lines of the rat blood-brain and blood-retinal barriers retain their phenotypic and immunological characteristics. *J Neuroimmunol*, 71(1-2):51–63.
- GRIEB, P., FORSTER, R. E., STROME, D., GOODWIN, C. W. et PAPE, P. C. (1985). O₂ exchange between blood and brain tissues studied with ¹⁸O₂ indicator-dilution technique. *J Appl Physiol*, 58(6):1929–41.
- GU, X., ZHANG, J., BRANN, D. W. et YU, F. S. (2003). Brain and retinal vascular endothelial cells with extended life span established by ectopic expression of telomerase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(7):3219–25.
- GUMBINER, B., LOWENKOPF, T. et APATIRA, D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(8):3460–4.
- GUMBLETON, M. et AUDUS, K. L. (2001). Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J Pharm Sci*, 90(11):1681–98.
- HAGENBUCH, B., GAO, B. et MEIER, P. J. (2002). Transport of xenobiotics across the blood-brain barrier. *News Physiol Sci*, 17:231–4.
- HAGENBUCH, B. et MEIER, P. J. (2004). Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family : phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch*, 447(5):653–65.
- HALLIER-VANUXEEM, D., PRIETO, P., CULOT, M., DIALLO, H., LANDRY, C., TAHTI, H. et CECHELLI, R. (2009). New strategy for alerting central nervous system toxicity : Integration of blood-brain barrier toxicity and permeability in neurotoxicity assessment. *Toxicol In Vitro*, 23(3):447–53.
- HAMILTON, N. B., ATTWELL, D. et HALL, C. N. (2010). Pericyte-mediated regulation of capillary diameter : a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front Neuroenergetics*, 2.
- HAMMARLUND-UDENAES, M., FRIDEN, M., SYVANEN, S. et GUPTA, A. (2008). On the rate and extent of drug delivery to the brain. *Pharm Res*, 25(8):1737–50.
- HART, M. N., VANDYK, L. F., MOORE, S. A., SHASBY, D. M. et CANCELLA, P. A. (1987). Differential opening of the brain endothelial barrier following neutralization of the endothelial luminal anionic charge in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol*, 46(2):141–53.
- HARTMANN, C., ZOZULYA, A., WEGENER, J. et GALLA, H. J. (2007). The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells : an in vitro study. *Exp Cell Res*, 313(7):1318–25. 0014-4827 (Print) 0014-4827 (Linking) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- HASHIZUME, K. et BLACK, K. L. (2002). Increased endothelial vesicular transport correlates with increased blood-tumor barrier permeability induced by bradykinin and leukotriene C₄. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(8):725–35.
- HASKINS, J., GU, L., WITTCHEN, E. S., HIBBARD, J. et STEVENSON, B. R. (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*, 141(1):199–208.
- HATHERELL, K., COURAUD, P. O., ROMERO, I. A., WEKSLER, B. et PILKINGTON, G. J. (2011). Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *J Neurosci Methods*, 199(2):223–9.
- HAWKINS, B. T. et DAVIS, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*, 57(2):173–85.

- HAWKINS, R. A., O'KANE, R. L., SIMPSON, I. A. et VINA, J. R. (2006). Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr*, 136(1 Suppl):218S–26S.
- HAYASHI, K., NAKAO, S., NAKAOKE, R., NAKAGAWA, S., KITAGAWA, N. et NIWA, M. (2004). Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul Pept*, 123(1-3):77–83. 0167-0115 (Print) 0167-0115 (Linking) Journal Article.
- HELLSTROM, M., GERHARDT, H., KALEN, M., LI, X., ERIKSSON, U., WOLBURG, H. et BETSHOLTZ, C. (2001). Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*, 153(3):543–53.
- HERMAN, I. M. et D'AMORE, P. A. (1985). Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. *J Cell Biol*, 101(1):43–52.
- HERVE, F., GHINEA, N. et SCHERRMANN, J. M. (2008). CNS delivery via adsorptive transcytosis. *Aaps J*, 10(3):455–72.
- HIGGINS, C. F. et LINTON, K. J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol*, 11(10):918–26.
- HIRASE, T., STADDON, J. M., SAITOU, M., ANDO-AKATSUKA, Y., ITOH, M., FURUSE, M., FUJIMOTO, K., TSUKITA, S. et RUBIN, L. L. (1997). Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci*, 110 (Pt 14):1603–13.
- HIRSCHI, K. K., ROHOVSKY, S. A., BECK, L. H., SMITH, S. R. et D'AMORE, P. A. (1999). Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ Res*, 84(3):298–305. 0009-7330 (Print) 0009-7330 (Linking) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- HIRSCHI, K. K., ROHOVSKY, S. A. et D'AMORE, P. A. (1998). PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol*, 141(3):805–14.
- HÜLSERMANN, U., HOFFMANN, M. M., MASSING, U. et FRICKER, G. (2009). Uptake of apolipoprotein E fragment coupled liposomes by cultured brain microvessel endothelial cells and intact brain capillaries. *J Drug Target*, 17(8):610–8. 1029-2330 (Electronic) 1026-7158 (Linking) Comparative Study Journal Article.
- HOPPER-BORGE, E., CHEN, Z. S., SHCHAVELEVA, I., BELINSKY, M. G. et KRUH, G. D. (2004). Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10) : resistance to docetaxel. *Cancer Res*, 64(14):4927–30.
- HORI, S., OHTSUKI, S., TACHIKAWA, M., KIMURA, N., KONDO, T., WATANABE, M., NAKASHIMA, E. et TERASAKI, T. (2004). Functional expression of rat ABCG2 on the luminal side of brain capillaries and its enhancement by astrocyte-derived soluble factor(s). *J Neurochem*, 90(3):526–36.
- HUAI-YUN, H., SECREST, D. T., MARK, K. S., CARNEY, D., BRANDQUIST, C., ELMQUIST, W. F. et MILLER, D. W. (1998). Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 243(3):816–20.
- HUANG, S. C., HOH, C., BARRIO, J. et PHELPS, M. (1998). *Measurements of blood-brain barrier permeability in humans with positron emission tomography*. Introduction to the blood-brain barrier : Methodology, biology and pathology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- HUBER, J. D., EGLETON, R. D. et DAVIS, T. P. (2001). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*, 24(12):719–25.

- HUTAMEKALIN, P., FARKAS, A. E., ORBOK, A., WILHELM, I., NAGYOSZI, P., VESZELKA, S., DELI, M. A., BUZAS, K., HUNYADI-GULYAS, E., MEDZIHRADESKY, K. F., MEKSURIYEN, D. et KRIZBAI, I. A. (2008). Effect of nicotine and polyaromatic hydrocarbons on cerebral endothelial cells. *Cell Biol Int*, 32(2):198–209.
- HUWYLER, J., WU, D. et PARDRIDGE, W. M. (1996). Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24):14164–9.
- IADECOLA, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 5(5):347–60.
- ICHIKAWA, N., NAORA, K., HIRANO, H., HASHIMOTO, M., MASUMURA, S. et IWAMOTO, K. (1996). Isolation and primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells for studying drug transport in vitro. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 36(1):45–52.
- IGARASHI, Y., UTSUMI, H., CHIBA, H., YAMADA-SASAMORI, Y., TOBIOKA, H., KAMIMURA, Y., FURUUCHI, K., KOKAI, Y., NAKAGAWA, T., MORI, M. et SAWADA, N. (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun*, 261(1):108–12. 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- IKEDA, E., FLAMME, I. et RISAU, W. (1996). Developing brain cells produce factors capable of inducing the HT7 antigen, a blood-brain barrier-specific molecule, in chick endothelial cells. *Neurosci Lett*, 209(3):149–52.
- IQBAL, U., ABULROB, A. et STANIMIROVIC, D. B. (2011). Integrated platform for brain imaging and drug delivery across the blood-brain barrier. *Methods Mol Biol*, 686:465–81.
- ITO, K., UCHIDA, Y., OHTSUKI, S., AIZAWA, S., KAWAKAMI, H., KATSUKURA, Y., KAMIE, J. et TERASAKI, T. (2011). Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. *J Pharm Sci*, 100(9):3939–50.
- ITOH, M. et BISSELL, M. J. (2003). The organization of tight junctions in epithelia : implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 8(4):449–62.
- ITOH, M., FURUSE, M., MORITA, K., KUBOTA, K., SAITOU, M. et TSUKITA, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol*, 147(6):1351–63.
- ITOH, Y., TORIUMI, H., YAMADA, S., HOSHINO, H. et SUZUKI, N. (2011). Astrocytes and pericytes cooperatively maintain a capillary-like structure composed of endothelial cells on gel matrix. *Brain Res*, 1406:74–83.
- JANZER, R. C. et RAFF, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325(6101):253–7.
- JEFFREY, P. et SUMMERFIELD, S. (2010). Assessment of the blood-brain barrier in CNS drug discovery. *Neurobiol Dis*, 37(1):33–7.
- JEFFREY, P. et SUMMERFIELD, S. G. (2007). Challenges for blood-brain barrier (BBB) screening. *Xenobiotica*, 37(10-11):1135–51.
- JOLY, B., LECUREUR, V., PUOZZO, C., GUILLOUZO, A. et FARDEL, O. (1996). Involvement of P-glycoprotein in an in vitro blood-brain barrier model. *Int J Oncol*, 9(5):1029–33.
- JOÓ, F. (1971). Increased production of coated vesicles in the brain capillaries during enhanced permeability of the blood-brain barrier. *Br J Exp Pathol*, 52(6):646–9.

- JOÓ, F. (1985). The blood-brain barrier in vitro : Ten years of research on microvessels isolated from the brain. *Neurochem Int*, 7(1):1–25.
- JOÓ, F. et KARNUSHINA, I. (1973). A procedure for the isolation of capillaries from rat brain. *Cytobios*, 8(29):41–8.
- JOUTEL, A. (2011). Pathogenesis of CADASIL : transgenic and knock-out mice to probe function and dysfunction of the mutated gene, Notch3, in the cerebrovasculature. *Bioessays*, 33(1):73–80.
- JOUTEL, A., CORPECHOT, C., DUCROS, A., VAHEDI, K., CHABRIAT, H., MOUTON, P., ALAMOWITCH, S., DOMENGA, V., CECILLION, M., MARECHAL, E., MACIAZEK, J., VAYSSIERE, C., CRUAUD, C., CABANIS, E. A., RUCHOUX, M. M., WEISSENBAACH, J., BACH, J. F., BOUSSER, M. G. et TOURNIER-LASSERVE, E. (1996). Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*, 383(6602):707–10.
- KACEM, K., LACOMBE, P., SEYLAZ, J. et BONVENTO, G. (1998). Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter : a confocal microscopy study. *Glia*, 23(1):1–10.
- KAGE, K., TSUKAHARA, S., SUGIYAMA, T., ASADA, S., ISHIKAWA, E., TSURUO, T. et SUGIMOTO, Y. (2002). Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int J Cancer*, 97(5):626–30.
- KANNAN, R., CHAKRABARTI, R., TANG, D., KIM, K. J. et KAPLOWITZ, N. (2000). GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes : evidence for luminal localization of Na⁺-dependent GSH transport in HCEC. *Brain Res*, 852(2):374–82.
- KASSNER, A. et THORNHILL, R. (2011). Measuring the integrity of the human blood-brain barrier using magnetic resonance imaging. *Methods Mol Biol*, 686:229–45.
- KATZ, D., TAUBENBERGER, J. K., CANNELLA, B., MCFARLIN, D. E., RAINE, C. S. et MCFARLAND, H. F. (1993). Correlation between magnetic resonance imaging findings and lesion development in chronic, active multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 34(5):661–9.
- KELLEY, C., D'AMORE, P., HECHTMAN, H. B. et SHEPRO, D. (1987). Microvascular pericyte contractility in vitro : comparison with other cells of the vascular wall. *J Cell Biol*, 104(3):483–90. 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- KENNEDY, M. B. (1995). Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem Sci*, 20(9):350.
- KERMODE, A. G., THOMPSON, A. J., TOFTS, P., MACMANUS, D. G., KENDALL, B. E., KINGSLEY, D. P., MOSELEY, I. F., RUDGE, P. et McDONALD, W. I. (1990). Breakdown of the blood-brain barrier precedes symptoms and other MRI signs of new lesions in multiple sclerosis. Pathogenetic and clinical implications. *Brain*, 113 (Pt 5):1477–89.
- KESSLER, R. M., GOBLE, J. C., BIRD, J. H., GIRTON, M. E., DOPPMAN, J. L., RAPOPORT, S. I. et BARRANGER, J. A. (1984). Measurement of blood-brain barrier permeability with positron emission tomography and [68Ga]EDTA. *J Cereb Blood Flow Metab*, 4(3):323–8.
- KIDO, Y., TAMAI, I., OKAMOTO, M., SUZUKI, F. et TSUJI, A. (2000). Functional clarification of MCT1-mediated transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier using in vitro cultured cells and in vivo BUI studies. *Pharm Res*, 17(1):55–62.
- KIKUCHI, R., KUSUHARA, H., SUGIYAMA, D. et SUGIYAMA, Y. (2003). Contribution of organic anion transporter 3 (Slc22a8) to the elimination of p-aminohippuric acid and benzylpenicillin across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther*, 306(1):51–8.

- KIM, J. A., TRAN, N. D., LI, Z., YANG, F., ZHOU, W. et FISHER, M. J. (2006). Brain endothelial hemostasis regulation by pericytes. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(2):209–17.
- KLEINSCHNITZ, C., BLECHARZ, K., KAHLES, T., SCHWARZ, T., KRAFT, P., GOBEL, K., MEUTH, S. G., BUREK, M., THUM, T., STOLL, G. et FORSTER, C. (2011). Glucocorticoid insensitivity at the hypoxic blood-brain barrier can be reversed by inhibition of the proteasome. *Stroke*, 42(4):1081–9.
- KONDO, T., HOSOYA, K., HORI, S., TOMI, M., OHTSUKI, S. et TERASAKI, T. (2005). PKC/MAPK signaling suppression by retinal pericyte conditioned medium prevents retinal endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol*, 203(2):378–86.
- KONRADI, C., RIEDERER, P., JELLINGER, K. et DENNEY, R. (1987). Cellular action of MAO inhibitors. *J Neural Transm Suppl*, 25:15–25.
- KRAUSE, D., KUNZ, J. et DERMIETZEL, R. (1993). Cerebral pericytes—a second line of defense in controlling blood-brain barrier peptide metabolism. *Adv Exp Med Biol*, 331:149–52.
- KREUTER, J. (2001). Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 47(1):65–81.
- KRISTENSSON, K. et OLSSON, Y. (1973). Accumulation of protein tracers in pericytes of the central nervous system following systemic injection in immature mice. *Acta Neurol Scand*, 49(2):189–94.
- KRUM, J. M. et ROSENSTEIN, J. M. (1993). Effect of astroglial degeneration on the blood-brain barrier to protein in neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 74(1):41–50.
- KUBOTA, K., FURUSE, M., SASAKI, H., SONODA, N., FUJITA, K., NAGAFUCHI, A. et TSUKITA, S. (1999). Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr Biol*, 9(18):1035–8.
- KUNZ, J., KRAUSE, D., KREMER, M. et DERMIETZEL, R. (1994). The 140-kDa protein of blood-brain barrier-associated pericytes is identical to aminopeptidase N. *J Neurochem*, 62(6):2375–86.
- KUSUHARA, H. et SUGIYAMA, Y. (2005). Active efflux across the blood-brain barrier : role of the solute carrier family. *NeuroRx*, 2(1):73–85.
- KUSUHARA, H., TERASAKI, T. et SUGIYAMA, Y. (2003). Brain efflux index method. Characterization of efflux transport across the blood-brain barrier. *Methods Mol Med*, 89:219–31.
- KUTCHER, M. E. et HERMAN, I. M. (2009). The pericyte : cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvasc Res*, 77(3):235–46.
- KUTCHER, M. E., KOLYADA, A. Y., SURKS, H. K. et HERMAN, I. M. (2007). Pericyte Rho GTPase mediates both pericyte contractile phenotype and capillary endothelial growth state. *Am J Pathol*, 171(2):693–701.
- LACOMBE, O., VIDEAU, O., CHEVILLON, D., GUYOT, A. C., CONTRERAS, C., BLONDEL, S., NICOLAS, L., GHETTAS, A., BENECH, H., THEVENOT, E., PRUVOST, A., BOLZE, S., KRZACZKOWSKI, L., PREVOST, C. et MABONDZO, A. (2011). In vitro primary human and animal cell-based blood-brain barrier models as a screening tool in drug discovery. *Mol Pharm*, 8(3):651–63.
- LAI, C. H. et KUO, K. H. (2005). The critical component to establish in vitro BBB model : Pericyte. *Brain Res Brain Res Rev*, 50(2):258–65.
- LAI, C. H., KUO, K. H. et LEO, J. M. (2005). Critical role of actin in modulating BBB permeability. *Brain Res Brain Res Rev*, 50(1):7–13.
- LAI, F. M., UDENFRIEND, S. et SPECTOR, S. (1975). Presence of norepinephrine and related enzymes in isolated brain microvessels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(11):4622–5.

- LAJOIE, P. et NABI, I. R. (2007). Regulation of raft-dependent endocytosis. *J Cell Mol Med*, 11(4):644–53. 1582-1838 (Print) 1582-1838 (Linking) Journal Article Review.
- LARSON, D. M., CARSON, M. P. et HAUDENSCHILD, C. C. (1987). Junctional transfer of small molecules in cultured bovine brain microvascular endothelial cells and pericytes. *Microvasc Res*, 34(2):184–99.
- LASBENNES, F. et GAYET, J. (1984). Capacity for energy metabolism in microvessels isolated from rat brain. *Neurochem Res*, 9(1):1–10.
- LAUER, R., BAUER, R., LINZ, B., PITTNER, F., PESCHEK, G. A., ECKER, G., FRIEDL, P. et NOE, C. R. (2004). Development of an in vitro blood-brain barrier model based on immortalized porcine brain microvascular endothelial cells. *Farmacology*, 59(2):133–7.
- LAWRENSON, J. G., REID, A. R., FINN, T. M., ORTE, C. et ALLT, G. (1999). Cerebral and pial microvessels : differential expression of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase. *Anat Embryol (Berl)*, 199(1):29–34.
- LECHARDEUR, D. et SCHERMAN, D. (1995). Functional expression of the P-glycoprotein mdr in primary cultures of bovine cerebral capillary endothelial cells. *Cell Biol Toxicol*, 11(5):283–93.
- LECHARDEUR, D., SCHWARTZ, B., PAULIN, D. et SCHERMAN, D. (1995). Induction of blood-brain barrier differentiation in a rat brain-derived endothelial cell line. *Exp Cell Res*, 220(1):161–70.
- LEE, G., DALLAS, S., HONG, M. et BENDAYAN, R. (2001). Drug transporters in the central nervous system : brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev*, 53(4):569–96.
- LEE, H. S., HAN, J., BAI, H. J. et KIM, K. W. (2009). Brain angiogenesis in developmental and pathological processes : regulation, molecular and cellular communication at the neurovascular interface. *Febs J*, 276(17):4622–35.
- LEE, S. W., KIM, W. J., CHOI, Y. K., SONG, H. S., SON, M. J., GELMAN, I. H., KIM, Y. J. et KIM, K. W. (2003). SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med*, 9(7):900–6.
- LEINO, R. L., GERHART, D. Z. et DREWES, L. R. (1999). Monocarboxylate transporter (MCT1) abundance in brains of suckling and adult rats : a quantitative electron microscopic immunogold study. *Brain Res Dev Brain Res*, 113(1-2):47–54.
- LI, G., SIMON, M. J., CANCEL, L. M., SHI, Z. D., JI, X., TARBELL, J. M., MORRISON, B., r. et FU, B. M. (2010). Permeability of endothelial and astrocyte cocultures : in vitro blood-brain barrier models for drug delivery studies. *Ann Biomed Eng*, 38(8):2499–511.
- LIM, J. C., KANIA, K. D., WIJESURIYA, H., CHAWLA, S., SETHI, J. K., PULASKI, L., ROMERO, I. A., COURAUD, P. O., WEKSLER, B. B., HLADKY, S. B. et BARRAND, M. A. (2008). Activation of beta-catenin signalling by GSK-3 inhibition increases p-glycoprotein expression in brain endothelial cells. *J Neurochem*, 106(4):1855–65.
- LINDAHL, P., JOHANSSON, B. R., LEVEEN, P. et BETSHOLTZ, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 277(5323):242–5.
- LINDBLOM, P., GERHARDT, H., LIEBNER, S., ABRAMSSON, A., ENGE, M., HELLSTROM, M., BACKSTROM, G., FREDRIKSSON, S., LANDEGREN, U., NYSTROM, H. C., BERGSTROM, G., DEJANA, E., OSTMAN, A., LINDAHL, P. et BETSHOLTZ, C. (2003). Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev*, 17(15):1835–40.

- LINTON, K. J. et HIGGINS, C. F. (2007). Structure and function of ABC transporters : the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch*, 453(5):555–67.
- LIPPOLDT, A., LIEBNER, S., ANDBJER, B., KALBACHER, H., WOLBURG, H., HALLER, H. et FUXE, K. (2000). Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell tight junctions and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C. *Neuroreport*, 11(7):1427–31.
- LOSCHER, W. et POTSCHKA, H. (2005). Blood-brain barrier active efflux transporters : ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx*, 2(1):86–98.
- LUND-ANDERSEN, H. (1979). Transport of glucose from blood to brain. *Physiol Rev*, 59(2):305–52.
- LUNDQUIST, S., RENFTEL, M., BRILLAULT, J., FENART, L., CECCELLI, R. et DEHOUCK, M. P. (2002). Prediction of drug transport through the blood-brain barrier in vivo : a comparison between two in vitro cell models. *Pharm Res*, 19(7):976–81.
- MACLEAN, A. G., ORANDLE, M. S., MACKEY, J., WILLIAMS, K. C., ALVAREZ, X. et LACKNER, A. A. (2002). Characterization of an in vitro rhesus macaque blood-brain barrier. *J Neuroimmunol*, 131(1-2):98–103.
- MALAKOUTIKHAH, M., TEIXIDO, M. et GIRALT, E. (2008). Toward an optimal blood-brain barrier shuttle by synthesis and evaluation of peptide libraries. *J Med Chem*, 51(16):4881–9.
- MANLEY, G. T., FUJIMURA, M., MA, T., NOSHITA, N., FILIZ, F., BOLLEN, A. W., CHAN, P. et VERKMAN, A. S. (2000). Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med*, 6(2):159–63.
- MARCHANT, C. A., BRIGGS, K. A. et LONG, A. (2008). In silico tools for sharing data and knowledge on toxicity and metabolism : derek for windows, meteor, and vitic. *Toxicol Mech Methods*, 18(2-3):177–87.
- MARK, K. S. et DAVIS, T. P. (2002). Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(4):H1485–94.
- MARQUET, F., TUNG, Y. S., TEICHERT, T., FERRERA, V. P. et KONOFAOU, E. E. (2011). Noninvasive, transient and selective blood-brain barrier opening in non-human primates in vivo. *PLoS One*, 6(7):e22598.
- MARRONI, M., KIGHT, K. M., HOSSAIN, M., CUCULLO, L., DESAI, S. Y. et JANIGRO, D. (2003). Dynamic in vitro model of the blood-brain barrier. 89.
- MARTIN, A. R., BAILIE, J. R., ROBSON, T., MCKEOWN, S. R., AL-ASSAR, O., MCFARLAND, A. et HIRST, D. G. (2000). Retinal pericytes control expression of nitric oxide synthase and endothelin-1 in microvascular endothelial cells. *Microvasc Res*, 59(1):131–9.
- MARTIN-PADURA, I., LOSTAGLIO, S., SCHNEEMANN, M., WILLIAMS, L., ROMANO, M., FRUSCELLA, P., PANZERI, C., STOPPACCIARO, A., RUCO, L., VILLA, A., SIMMONS, D. et DEJANA, E. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol*, 142(1):117–27.
- MASON, B. P. (2009). *High-Throuput Measurement of Physicochemical Properties*. Drug Bioavailability : Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability. Wiley-VCH, Weinheim.
- MATO, M., OOKAWARA, S. et KURIHARA, K. (1980). Uptake of exogenous substances and marked infoldings of the fluorescent granular pericyte in cerebral fine vessels. *Am J Anat*, 157(3):329–32.
- MATSUGI, T., CHEN, Q. et ANDERSON, D. R. (1997). Contractile responses of cultured bovine retinal pericytes to angiotensin II. *Arch Ophthalmol*, 115(10):1281–5.

- MAXWELL, K., BERLINER, J. A. et CANCELLA, P. A. (1987). Induction of gamma-glutamyl transpeptidase in cultured cerebral endothelial cells by a product released by astrocytes. *Brain Res*, 410(2):309–14.
- MAYER, S., MAICKEL, R. P. et BRODIE, B. B. (1959). Kinetics of penetration of drugs and other foreign compounds into cerebrospinal fluid and brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 127(3):205–211.
- MAZOYER, B. (2002). L'imagerie cérébrale : IRM et TEP.
- MCDONALD, D. M., BAILIE, J. R., ARCHER, D. B. et CHAKRAVARTHY, U. (1995). Characterization of endothelin A (ETA) and endothelin B (ETB) receptors in cultured bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36(6):1088–94.
- MCILROY, M., O'ROURKE, M., MCKEOWN, S. R., HIRST, D. G. et ROBSON, T. (2006). Pericytes influence endothelial cell growth characteristics : role of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). *Cardiovasc Res*, 69(1):207–17.
- MEAIRS, S. et ALONSO, A. (2007). Ultrasound, microbubbles and the blood-brain barrier. *Prog Biophys Mol Biol*, 93(1-3):354–62.
- MEHDIPOUR, A. R. et HAMIDI, M. (2009). Brain drug targeting : a computational approach for overcoming blood-brain barrier. *Drug Discov Today*, 14(21-22):1030–6.
- MENA, I. et COTZIAS, G. C. (1975). Protein intake and treatment of Parkinson's disease with levodopa. *N Engl J Med*, 292(4):181–4.
- MENSCH, J., MELIS, A., MACKIE, C., VERRECK, G., BREWSTER, M. E. et AUGUSTIJNS, P. (2010). Evaluation of various PAMPA models to identify the most discriminating method for the prediction of BBB permeability. *Eur J Pharm Biopharm*, 74(3):495–502.
- MENSCH, J., OYARZABAL, J., MACKIE, C. et AUGUSTIJNS, P. (2009). In vivo, in vitro and in silico methods for small molecule transfer across the BBB. *J Pharm Sci*, 98(12):4429–68.
- MERCIER, C., MASSEGUIN, C., ROUX, F., GABRION, J. et SCHERRMANN, J. M. (2004). Expression of P-glycoprotein (ABCB1) and Mrp1 (ABCC1) in adult rat brain : focus on astrocytes. *Brain Res*, 1021(1):32–40.
- MERTSCH, K. et MAAS, J. (2002). Blood-brain barrier penetration and drug development from an industrial point of view. *Current Medicinal Chemistry -Central Nervous System Agents*, 2(3):187–201.
- MEYER, J., MISCHECK, U., VEYHL, M., HENZEL, K. et GALLA, H. J. (1990). Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res*, 514(2):305–9.
- MILLER, D. S., NOBMANN, S. N., GUTMANN, H., TOEROEK, M., DREWE, J. et FRICKER, G. (2000). Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy. *Mol Pharmacol*, 58(6):1357–67.
- MISRA, A., GANESH, S., SHAHIWALA, A. et SHAH, S. P. (2003). Drug delivery to the central nervous system : a review. *J Pharm Pharm Sci*, 6(2):252–73.
- MKRTCHYAN, H., SCHELER, S., KLEIN, I., FAHR, A., COURAUD, P. O., ROMERO, I. A., WEKSLER, B. et LIEHR, T. (2009). Molecular cytogenetic characterization of the human cerebral microvessel endothelial cell line hCMEC/D3. *Cytogenet Genome Res*, 126(4):313–7.
- MOORADIAN, D. L. et DIGLIO, C. A. (1991). Production of a transforming growth factor-beta-like growth factor by RSV-transformed rat cerebral microvascular endothelial cells. *Tumour Biol*, 12(3):171–83.

- MORI, S., OHTSUKI, S., TAKANAGA, H., KIKKAWA, T., KANG, Y. S. et TERASAKI, T. (2004). Organic anion transporter 3 is involved in the brain-to-blood efflux transport of thiopurine nucleobase analogs. *J Neurochem*, 90(4):931–41.
- MORI, S., TAKANAGA, H., OHTSUKI, S., DEGUCHI, T., KANG, Y. S., HOSOYA, K. et TERASAKI, T. (2003). Rat organic anion transporter 3 (rOAT3) is responsible for brain-to-blood efflux of homovanillic acid at the abluminal membrane of brain capillary endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(4):432–40.
- MORITA, T., MIZUTANI, Y., SAWADA, M. et SHIMADA, A. (2005). Immunohistochemical and ultrastructural findings related to the blood–brain barrier in the blood vessels of the cerebral white matter in aged dogs. *J Comp Pathol*, 133(1):14–22.
- MÉRESSE, S., DEHOUC, M. P., DELORME, P., BENSAID, M., TAUBER, J. P., DELBART, C., FRUCHART, J. C. et CECCELLI, R. (1989). Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J Neurochem*, 53(5):1363–71.
- MURUGANANDAM, A., HERX, L. M., MONETTE, R., DURKIN, J. P. et STANIMIROVIC, D. B. (1997). Development of immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Faseb J*, 11(13):1187–97.
- MYSIOREK, C., CULOT, M., DEHOUC, L., DERUDAS, B., STAELS, B., BORDET, R., CECCELLI, R., FENART, L. et BEREZOWSKI, V. (2009). Peroxisome-proliferator-activated receptor- α activation protects brain capillary endothelial cells from oxygen-glucose deprivation-induced hyperpermeability in the blood-brain barrier. *Curr Neurovasc Res*, 6(3):181–93.
- NAG, S. (1990). Presence of transendothelial channels in cerebral endothelium in chronic hypertension. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, 51:335–7. 0065-1419 (Print) 0065-1419 (Linking) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- NAG, S. (2003). Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels. *Methods Mol Med*, 89:3–36.
- NAG, S. (2011). Morphology and properties of brain endothelial cells. *Methods Mol Biol*, 686:3–47.
- NAGARAJA, T. N., KNIGHT, R. A., EWING, J. R., KARKI, K., NAGESH, V. et FENSTERMACHER, J. D. (2011). Multiparametric magnetic resonance imaging and repeated measurements of blood-brain barrier permeability to contrast agents. *Methods Mol Biol*, 686:193–212.
- NAKAGAWA, S., DELI, M. A., KAWAGUCHI, H., SHIMIZUDANI, T., SHIMONO, T., KITTEL, A., TANAKA, K. et NIWA, M. (2009). A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*, 54(3-4):253–63.
- NAKAGAWA, S., DELI, M. A., NAKAO, S., HONDA, M., HAYASHI, K., NAKAOKE, R., KATAOKA, Y. et NIWA, M. (2007). Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol*, 27(6):687–94.
- NAKAZAWA, E. et ISHIKAWA, H. (1998). Ultrastructural observations of astrocyte end-feet in the rat central nervous system. *J Neurocytol*, 27(6):431–40.
- NATHKE, I. S., HEUSER, J., LUPAS, A., STOCK, J., TURCK, C. W. et BRODSKY, F. M. (1992). Folding and trimerization of clathrin subunits at the triskelion hub. *Cell*, 68(5):899–910.
- NAYAK, R. C., BERMAN, A. B., GEORGE, K. L., EISENBARTH, G. S. et KING, G. L. (1988). A monoclonal antibody (3G5)-defined ganglioside antigen is expressed on the cell surface of microvascular pericytes. *J Exp Med*, 167(3):1003–15.

- NEHLS, V. et DRENCKHAHN, D. (1991). Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *J Cell Biol*, 113(1):147–54.
- NEHLS, V. et DRENCKHAHN, D. (1993). The versatility of microvascular pericytes : from mesenchyme to smooth muscle ? *Histochemistry*, 99(1):1–12.
- NIELSEN, S., NAGELHUS, E. A., AMIRY-MOGHADDAM, M., BOURQUE, C., AGRE, P. et OTTERSEN, O. P. (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells : high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*, 17(1):171–80. 0270-6474 (Print) 0270-6474 (Linking) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- NIES, A. T., JEDLITSCHKY, G., KONIG, J., HEROLD-MENDE, C., STEINER, H. H., SCHMITT, H. P. et KEPPLER, D. (2004). Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience*, 129(2):349–60.
- NITTA, T., HATA, M., GOTOH, S., SEO, Y., SASAKI, H., HASHIMOTO, N., FURUSE, M. et TSUKITA, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*, 161(3): 653–60.
- O'DONNELL, M. E., LAM, T. I., TRAN, L. Q., FOROUTAN, S. et ANDERSON, S. E. (2006). Estradiol reduces activity of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter and decreases edema formation in permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(10):1234–49.
- OHTSUKI, S. (2004). New aspects of the blood-brain barrier transporters ; its physiological roles in the central nervous system. *Biol Pharm Bull*, 27(10):1489–96.
- OHTSUKI, S., YAMAGUCHI, H., KATSUKURA, Y., ASASHIMA, T. et TERASAKI, T. (2008). mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J Neurochem*, 104(1):147–54.
- OISHI, K., KAMIYASHIKI, T. et ITO, Y. (2007). Isometric contraction of microvascular pericytes from mouse brain parenchyma. *Microvasc Res*, 73(1):20–8.
- OLDENDORF, W. H. (1970). Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard. *Brain Res*, 24(2):372–6.
- OLDENDORF, W. H., CORNFORD, M. E. et BROWN, W. J. (1977). The large apparent work capability of the blood-brain barrier : a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol*, 1(5):409–17.
- OMIDI, Y., CAMPBELL, L., BARAR, J., CONNELL, D., AKHTAR, S. et GUMBLETON, M. (2003). Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Res*, 990(1-2):95–112.
- ORLIDGE, A. et D'AMORE, P. A. (1987). Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol*, 105(3):1455–62.
- OSE, A., ITO, M., KUSUHARA, H., YAMATSUGU, K., KANAI, M., SHIBASAKI, M., HOSOKAWA, M., SCHUETZ, J. D. et SUGIYAMA, Y. (2009). Limited brain distribution of [3R,4R,5S]-4-acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxyl ate phosphate (Ro 64-0802), a pharmacologically active form of oseltamivir, by active efflux across the blood-brain barrier mediated by organic anion transporter 3 (Oat3/Slc22a8) and multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4/Abcc4). *Drug Metab Dispos*, 37(2):315–21.
- PAEMELEIRE, K. (2002). The cellular basis of neurovascular metabolic coupling. *Acta Neurol Belg*, 102(4): 153–7. 0300-9009 (Print) 0300-9009 (Linking) Journal Article Review.

- PAN, W., KASTIN, A. J., DANIEL, J., YU, C., BARYSHNIKOVA, L. M. et von BARTHELD, C. S. (2007). TNFalpha trafficking in cerebral vascular endothelial cells. *J Neuroimmunol*, 185(1-2):47–56.
- PANGALOS, M. N., SCHECHTER, L. E. et HURKO, O. (2007). Drug development for CNS disorders : strategies for balancing risk and reducing attrition. *Nat Rev Drug Discov*, 6(7):521–32.
- PAPADOPOULOS, M. C., MANLEY, G. T., KRISHNA, S. et VERKMAN, A. S. (2004). Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *Faseb J*, 18(11):1291–3.
- PAPADOPOULOS, M. C. et VERKMAN, A. S. (2005). Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem*, 280(14):13906–12.
- PARDRIDGE, W. M. (1998). *Isolated brain capillaries : an in vitro model of blood-brain barrier research*. . Introduction to the Blood-Brain Barrier : Methodology, Biology and Pathology. Cambridge University Press.
- PARDRIDGE, W. M. (2003). Blood-brain barrier drug targeting : the future of brain drug development. *Mol Interv*, 3(2):90–105, 51.
- PARDRIDGE, W. M. (2005). The blood-brain barrier : bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*, 2(1):3–14.
- PARDRIDGE, W. M. (2007). Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*, 12(1-2):54–61.
- PARDRIDGE, W. M., BOADO, R. J. et FARRELL, C. R. (1990). Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem*, 265(29):18035–40.
- PARDRIDGE, W. M., BUCIAK, J. L. et FRIDEN, P. M. (1991). Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 259(1):66–70.
- PARKINSON, F. E. et HACKING, C. (2005). Pericyte abundance affects sucrose permeability in cultures of rat brain microvascular endothelial cells. *Brain Res*, 1049(1):8–14.
- PARTON, R. G. et RICHARDS, A. A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis : new insights and common mechanisms. *Traffic*, 4(11):724–38.
- PATLAK, C. S., BLASBERG, R. G. et FENSTERMACHER, J. D. (1983). Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. *J Cereb Blood Flow Metab*, 3(1):1–7.
- PENNELL, N. A. et STREIT, W. J. (1998). Tracing of fluoro-gold prelabeled microglia injected into the adult rat brain. *Glia*, 23(1):84–8.
- PEPPER, M. S. (1997). Transforming growth factor-beta : vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 8(1):21–43.
- PEPPIATT, C. M., HOWARTH, C., MOBBS, P. et ATTWELL, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 443(7112):700–4.
- PERRIÈRE, N., DEMEUSE, P., GARCIA, E., REGINA, A., DEBRAY, M., ANDREUX, J. P., COUVREUR, P., SCHERRMANN, J. M., TEMSAMANI, J., COURAUD, P. O., DELI, M. A. et ROUX, F. (2005). Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem*, 93(2):279–89.
- PERRIÈRE, N., YOUSIF, S., CAZAUBON, S., CHAVEROT, N., BOURASSET, F., CISTERNINO, S., DECLEVES, X., HORI, S., TERASAKI, T., DELI, M., SCHERRMANN, J. M., TEMSAMANI, J., ROUX, F. et COURAUD, P. O. (2007). A functional in vitro model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters. *Brain Res*, 1150:1–13.

- PERRY, M. M. et GILBERT, A. B. (1979). Yolk transport in the ovarian follicle of the hen (*Gallus domesticus*) : lipoprotein-like particles at the periphery of the oocyte in the rapid growth phase. *J Cell Sci*, 39:257–72.
- PERSIDSKY, Y., RAMIREZ, S. H., HAORAH, J. et KANMOGNE, G. D. (2006). Blood-brain barrier : structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1(3): 223–36.
- PIDGEON, C., ONG, S., LIU, H., QIU, X., PIDGEON, M., DANTZIG, A. H., MUNROE, J., HORNBACK, W. J., KASHER, J. S., GLUNZ, L. et AL. (1995). IAM chromatography : an in vitro screen for predicting drug membrane permeability. *J Med Chem*, 38(4):590–4.
- PLATEEL, M., TEISSIER, E. et CECHELLI, R. (1997). Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J Neurochem*, 68(2):874–7.
- POLLER, B., WAGENAAR, E., TANG, S. C. et SCHINKEL, A. H. (2011). Double-transduced MDCKII cells to study human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) interplay in drug transport across the blood-brain barrier. *Mol Pharm*, 8(2):571–82.
- POLT, R., PORRECA, F., SZABO, L. Z., BILSKY, E. J., DAVIS, P., ABBRUSCATO, T. J., DAVIS, T. P., HARVATH, R., YAMAMURA, H. I. et HRUBY, V. J. (1994). Glycopeptide enkephalin analogues produce analgesia in mice : evidence for penetration of the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(15):7114–8.
- POTSCHKA, H. (2010a). Targeting regulation of ABC efflux transporters in brain diseases : a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther*, 125(1):118–27.
- POTSCHKA, H. (2010b). Targeting the brain—surmounting or bypassing the blood-brain barrier. *Handb Exp Pharmacol*, (197):411–31.
- PRIETO, P., BLAAUBOER, B. J., de BOER, A. G., BOVERI, M., CECHELLI, R., CLEMEDSON, C., COECKE, S., FORSBY, A., GALLA, H. J., GARBERG, P., GREENWOOD, J., PRICE, A. et TAHTI, H. (2004). Blood-brain barrier in vitro models and their application in toxicology. The report and recommendations of ECVAM Workshop 49. *Altern Lab Anim*, 32(1):37–50.
- PRUDHOMME, J. G., SHERMAN, I. W., LAND, K. M., MOSES, A. V., STENGLEIN, S. et NELSON, J. A. (1996). Studies of *Plasmodium falciparum* cytoadherence using immortalized human brain capillary endothelial cells. *Int J Parasitol*, 26(6):647–55.
- QUAEGEBEUR, A., SEGURA, I. et CARMELIET, P. (2010). Pericytes : blood-brain barrier safeguards against neurodegeneration ? *Neuron*, 68(3):321–3.
- RAMSAUER, M., KRAUSE, D. et DERMIETZEL, R. (2002). Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *Faseb J*, 16(10):1274–6.
- RAMSAUER, M., KUNZ, J., KRAUSE, D. et DERMIETZEL, R. (1998). Regulation of a blood-brain barrier-specific enzyme expressed by cerebral pericytes (pericytic aminopeptidase N/pAPN) under cell culture conditions. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18(11):1270–81.
- RAUB, T. J. (1996). Signal transduction and glial cell modulation of cultured brain microvessel endothelial cell tight junctions. *Am J Physiol*, 271(2 Pt 1):C495–503.
- RAUB, T. J., KUENTZEL, S. L. et SAWADA, G. A. (1992). Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro : barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Exp Cell Res*, 199(2):330–40.
- RAUTIO, J., LAINE, K., GYNTHNER, M. et SAVOLAINEN, J. (2008). Prodrug approaches for CNS delivery. *Aaps J*, 10(1):92–102.

- RAZANI, B., WOODMAN, S. E. et LISANTI, M. P. (2002). Caveolae : from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev*, 54(3):431–67.
- REDZIC, Z. (2011). Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers : similarities and differences. *Fluids Barriers CNS*, 8(1):3.
- REESE, T. S. et KARNOVSKY, M. J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*, 34(1):207–17.
- REGINA, A., KOMAN, A., PICIOTTI, M., EL HAFNY, B., CENTER, M. S., BERGMANN, R., COURAUD, P. O. et ROUX, F. (1998). Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem*, 71(2):705–15.
- REGINA, A., ROMERO, I. A., GREENWOOD, J., ADAMSON, P., BOURRE, J. M., COURAUD, P. O. et ROUX, F. (1999). Dexamethasone regulation of P-glycoprotein activity in an immortalized rat brain endothelial cell line, GPNT. *J Neurochem*, 73(5):1954–63.
- REICHEL, A. (2006). The role of blood-brain barrier studies in the pharmaceutical industry. *Curr Drug Metab*, 7(2):183–203.
- REICHEL, A. (2009). Addressing central nervous system (CNS) penetration in drug discovery : basics and implications of the evolving new concept. *Chem Biodivers*, 6(11):2030–49.
- REICHEL, A. et BEGLEY, D. J. (1998). Potential of immobilized artificial membranes for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. *Pharm Res*, 15(8):1270–4.
- RISAU, W., DINGLER, A., ALBRECHT, U., DEHOUECK, M. P. et CECHELLI, R. (1992). Blood-brain barrier pericytes are the main source of gamma-glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries. *J Neurochem*, 58(2):667–72.
- RISAU, W., ENGELHARDT, B. et WEKERLE, H. (1990). Immune function of the blood-brain barrier : incomplete presentation of protein (auto-)antigens by rat brain microvascular endothelium in vitro. *J Cell Biol*, 110(5):1757–66.
- ROBERTS, L. M., BLACK, D. S., RAMAN, C., WOODFORD, K., ZHOU, M., HAGGERTY, J. E., YAN, A. T., CWIRLA, S. E. et GRINDSTAFF, K. K. (2008). Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience*, 155(2):423–38.
- ROBEY, R. W., TO, K. K., POLGAR, O., DOHSE, M., FETSCH, P., DEAN, M. et BATES, S. E. (2009). ABCG2 : a perspective. *Adv Drug Deliv Rev*, 61(1):3–13.
- RODRIGUEZ-BAEZA, A., REINA-DE LA TORRE, F., ORTEGA-SANCHEZ, M. et SAHUQUILLO-BARRIS, J. (1998). Perivascular structures in corrosion casts of the human central nervous system : a confocal laser and scanning electron microscope study. *Anat Rec*, 252(2):176–84.
- RONALDSON, P. T., BENDAYAN, M., GINGRAS, D., PIQUETTE-MILLER, M. et BENDAYAN, R. (2004). Cellular localization and functional expression of P-glycoprotein in rat astrocyte cultures. *J Neurochem*, 89(3):788–800.
- ROUGET, C. (1873). Mémoire sur le développement, la structure et les propriétés physiologiques des capillaires sanguins et lymphatiques. *Arch Physiol Norm Path*, 5:603–663.
- ROUX, F. et COURAUD, P. O. (2005). Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. *Cell Mol Neurobiol*, 25(1):41–58.

- ROUX, F., DURIEU-TRAUTMANN, O., CHAVEROT, N., CLAIRE, M., MAILLY, P., BOURRE, J. M., STROBERG, A. D. et COURAUD, P. O. (1994). Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol*, 159(1):101–13.
- ROVIDA, C. et HARTUNG, T. (2009). Re-evaluation of animal numbers and costs for in vivo tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals - a report by the transatlantic think tank for toxicology (t(4)). *Altex*, 26(3):187–208.
- RUBIN, L. L., HALL, D. E., PORTER, S., BARBU, K., CANNON, C., HORNER, H. C., JANATPOUR, M., LIAW, C. W., MANNING, K., MORALES, J. et et AL. (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol*, 115(6):1725–35.
- RUCHOUX, M. M., BRULIN, P., BRILLAULT, J., DEHOUC, M. P., CECHELLI, R. et BATAILLARD, M. (2002). Lessons from CADASIL. *Ann N Y Acad Sci*, 977:224–31.
- RUCKER, H. K., WYNDER, H. J. et THOMAS, W. E. (2000). Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull*, 51(5):363–9.
- RUSSEL, F. G., MASEREEUW, R. et van AUBEL, R. A. (2002). Molecular aspects of renal anionic drug transport. *Annu Rev Physiol*, 64:563–94.
- RUSSELL, W. M. S. et BURCH, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. . Methuen & Co., London, special edition published by universities federation for animal welfare (ufaw), 1992. édition.
- RUTTEN, M. J., HOOVER, R. L. et KARNOVSKY, M. J. (1987). Electrical resistance and macromolecular permeability of brain endothelial monolayer cultures. *Brain Res*, 425(2):301–10.
- SAADOUN, S., TAIT, M. J., REZA, A., DAVIES, D. C., BELL, B. A., VERKMAN, A. S. et PAPADOPOULOS, M. C. (2009). AQP4 gene deletion in mice does not alter blood-brain barrier integrity or brain morphology. *Neuroscience*, 161(3):764–72. 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Review.
- SAITOU, M., FURUSE, M., SASAKI, H., SCHULZKE, J. D., FROMM, M., TAKANO, H., NODA, T. et TSUKITA, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*, 11(12):4131–42.
- SAKAKIBARA, A., FURUSE, M., SAITOU, M., ANDO-AKATSUKA, Y. et TSUKITA, S. (1997). Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol*, 137(6):1393–401.
- SANO, Y., SHIMIZU, F., ABE, M., MAEDA, T., KASHIWAMURA, Y., OHTSUKI, S., TERASAKI, T., OBINATA, M., KAJIWARA, K., FUJII, M., SUZUKI, M. et KANDA, T. (2010). Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. *J Cell Physiol*, 225(2):519–28.
- SASONGKO, L., LINK, J. M., MUZI, M., MANKOFF, D. A., YANG, X., COLLIER, A. C., SHONER, S. C. et UNADKAT, J. D. (2005). Imaging P-glycoprotein transport activity at the human blood-brain barrier with positron emission tomography. *Clin Pharmacol Ther*, 77(6):503–14.
- SATO, Y., TSUBOI, R., LYONS, R., MOSES, H. et RIFKIN, D. B. (1990). Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells : a self-regulating system. *J Cell Biol*, 111(2):757–63. 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- SATOH, H., ZHONG, Y., ISOMURA, H., SAITOH, M., ENOMOTO, K., SAWADA, N. et MORI, M. (1996). Localization of 7H6 tight junction-associated antigen along the cell border of vascular endothelial cells correlates with paracellular barrier function against ions, large molecules, and cancer cells. *Exp Cell Res*, 222(2):269–74.

- SAUNDERS, N. R., KNOTT, G. W. et DZIEGIELEWSKA, K. M. (2000). Barriers in the immature brain. *Cell Mol Neurobiol*, 20(1):29–40.
- SAVETTIERI, G., DI LIEGRO, I., CATANIA, C., LICATA, L., PITARRESI, G. L., D'AGOSTINO, S., SCHIERA, G., DE CARO, V., GIANDALIA, G., GIANNOLA, L. I. et CESTELLI, A. (2000). Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *Neuroreport*, 11(5):1081–4.
- SCHIERA, G., SALA, S., GALLO, A., RAFFA, M. P., PITARRESI, G. L., SAVETTIERI, G. et DI LIEGRO, I. (2005). Permeability properties of a three-cell type in vitro model of blood-brain barrier. *J Cell Mol Med*, 9(2):373–9.
- SCHINKEL, A. H. (1999). P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, 36(2-3):179–194.
- SCHINKEL, A. H., ARCECI, R. J., SMIT, J. J., WAGENAAR, E., BAAS, F., DOLLE, M., TSURUO, T., MECHETNER, E. B., RONINSON, I. B. et BORST, P. (1993). Binding properties of monoclonal antibodies recognizing external epitopes of the human MDR1 P-glycoprotein. *Int J Cancer*, 55(3):478–84. 0020-7136 (Print) 0020-7136 (Linking) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- SCHINKEL, A. H. et JONKER, J. W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family : an overview. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(1):3–29.
- SCHINKEL, A. H., SMIT, J. J., van TELLINGEN, O., BEIJNEN, J. H., WAGENAAR, E., van DEEMTER, L., MOL, C. A., van der VALK, M. A., ROBANUS-MAANDAG, E. C., te RIELE, H. P. et al. (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77(4):491–502.
- SCHLACHETZKI, F. et PARDRIDGE, W. M. (2003). P-glycoprotein and caveolin-1 α in endothelium and astrocytes of primate brain. *Neuroreport*, 14(16):2041–6.
- SCHÖNFELDER, U., HOFER, A., PAUL, M. et FUNK, R. H. (1998). In situ observation of living pericytes in rat retinal capillaries. *Microvasc Res*, 56(1):22–9.
- SCHREIBELT, G., KOOIJ, G., REIJERKERK, A., van DOORN, R., GRINGHUIS, S. I., van der POL, S., WEKSLER, B. B., ROMERO, I. A., COURAUD, P. O., PIONTEK, J., BLASIG, I. E., DIJKSTRA, C. D., RONKEN, E. et de VRIES, H. E. (2007). Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *Faseb J*, 21(13):3666–76.
- SEETHARAMAN, S., BARRAND, M. A., MASKELL, L. et SCHEPER, R. J. (1998). Multidrug resistance-related transport proteins in isolated human brain microvessels and in cells cultured from these isolates. *J Neurochem*, 70(3):1151–9.
- SEVIN, E., SZORATH, E., MARTINSSON, S., DAHLSTRÖM, J., CULOT, M., RENFTEL, M., CECCELLI, R. et LUNDQUIST, S. (2011). Assessing the free brain/free plasma ratio in vitro in early drug discovery. Cerebral Vascular Biology International Conference 2011, Leiden, Netherlands.
- SHARP, C. D., JAWAHAR, A., WARREN, A. C., ELROD, J. W., NANDA, A. et ALEXANDER, J. S. (2003). Gamma knife irradiation increases cerebral endothelial expression of intercellular adhesion molecule 1 and E-selectin. *Neurosurgery*, 53(1):154–60 ; discussion 160–1.
- SHAWAHNA, R., UCHIDA, Y., DECLEVES, X., OHTSUKI, S., YOUSIF, S., DAUCHY, S., JACOB, A., CHASOUX, F., DAUMAS-DUPOUR, C., COURAUD, P. O., TERASAKI, T. et SCHERRMANN, J. M. (2011). Transcriptomic and Quantitative Proteomic Analysis of Transporters and Drug Metabolizing Enzymes in Freshly Isolated Human Brain Microvessels. *Mol Pharm*. 1543-8392 (Electronic) 1543-8384 (Linking) Journal article.

- SHAYAN, G., CHOI, Y. S., SHUSTA, E. V., SHULER, M. L. et LEE, K. H. (2010). Murine in vitro model of the blood-brain barrier for evaluating drug transport. *Eur J Pharm Sci*, 42(1-2):148–55.
- SHAYAN, G., CHOI, Y. S., SHUSTA, E. V., SHULER, M. L. et LEE, K. H. (2011). Murine in vitro model of the blood-brain barrier for evaluating drug transport. *Eur J Pharm Sci*, 42(1-2):148–55.
- SHEPRO, D. et MOREL, N. M. (1993). Pericyte physiology. *Faseb J*, 7(11):1031–8.
- SHI, N., ZHANG, Y., ZHU, C., BOADO, R. J. et PARDRIDGE, W. M. (2001). Brain-specific expression of an exogenous gene after i.v. administration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(22):12754–9.
- SHIMIZU, F., SANO, Y., MAEDA, T., ABE, M. A., NAKAYAMA, H., TAKAHASHI, R., UEDA, M., OHTSUKI, S., TERASAKI, T., OBINATA, M. et KANDA, T. (2008). Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. *J Cell Physiol*, 217(2):388–99.
- SHIVERS, R. R., BETZ, A. L. et GOLDSTEIN, G. W. (1984). Isolated rat brain capillaries possess intact, structurally complex, interendothelial tight junctions ; freeze-fracture verification of tight junction integrity. *Brain Res*, 324(2):313–22.
- SHIWEN, X., RAJKUMAR, V., DENTON, C. P., LEASK, A. et ABRAHAM, D. J. (2009). Pericytes display increased CCN2 expression upon culturing. *J Cell Commun Signal*, 3(1):61–4.
- SIDDHARTHAN, V., KIM, Y. V., LIU, S. et KIM, K. S. (2007). Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain Res*, 1147:39–50.
- SIFLINGER-BIRNBOIM, A., DEL VECCHIO, P. J., COOPER, J. A., BLUMENSTOCK, F. A., SHEPARD, J. M. et MALIK, A. B. (1987). Molecular sieving characteristics of the cultured endothelial monolayer. *J Cell Physiol*, 132(1):111–7.
- SIMIONESCU, N., SIMINOESCU, M. et PALADE, G. E. (1975). Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J Cell Biol*, 64(3):586–607.
- SIMPSON, I. A., CARRUTHERS, A. et VANNUCCI, S. J. (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism : the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27(11):1766–91.
- SIMS, D. E. (1991). Recent advances in pericyte biology—implications for health and disease. *Can J Cardiol*, 7(10):431–43.
- SMALL, R. K., WATKINS, B. A., MUNRO, P. M. et LIU, D. (1993). Functional properties of retinal Muller cells following transplantation to the anterior eye chamber. *Glia*, 7(2):158–69.
- SMITH, Q. R. (2003). *A review of blood-brain barrier transport techniques*, volume 89 de *Methods in Molecular Medicine 89 : The Blood-brain Barrier : Biology and Research Protocols*. Humana Press, Totowa.
- SMITH, Q. R. et ALLEN, D. D. (2003). In situ brain perfusion technique. *Methods Mol Med*, 89:209–18.
- SMITH, Q. R. et TAKASATO, Y. (1986). Kinetics of amino acid transport at the blood-brain barrier studied using an in situ brain perfusion technique. *Ann N Y Acad Sci*, 481:186–201.
- SOBUE, K., YAMAMOTO, N., YONEDA, K., HODGSON, M. E., YAMASHIRO, K., TSURUOKA, N., TSUDA, T., KATSUYA, H., MIURA, Y., ASAI, K. et KATO, T. (1999). Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci Res*, 35(2):155–64.

- SONG, L. et PACTER, J. S. (2003). Culture of murine brain microvascular endothelial cells that maintain expression and cytoskeletal association of tight junction-associated proteins. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 39(7):313–20.
- SORANI, M. D., MANLEY, G. T. et GIACOMINI, K. M. (2008). Genetic variation in human aquaporins and effects on phenotypes of water homeostasis. *Hum Mutat*, 29(9):1108–17.
- STALLCUP, W. B. (2002). The NG2 proteoglycan : past insights and future prospects. *J Neurocytol*, 31(6-7):423–35.
- STAMATOVIC, S. M., SHAKUI, P., KEEP, R. F., MOORE, B. B., KUNKEL, S. L., VAN ROOIJEN, N. et ANDJELKOVIC, A. V. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25(5):593–606. 0271-678X (Print) 0271-678X (Linking) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- STANNESS, K. A., GUATTEO, E. et JANIGRO, D. (1996). A dynamic model of the blood-brain barrier "in vitro". *Neurotoxicology*, 17(2):481–96.
- STANNESS, K. A., WESTRUM, L. E., FORNACIARI, E., MASCAGNI, P., NELSON, J. A., STENGLEIN, S. G., MYERS, T. et JANIGRO, D. (1997). Morphological and functional characterization of an in vitro blood-brain barrier model. *Brain Res*, 771(2):329–42.
- STAUD, F., CECKOVA, M., MICUDA, S. et PAVEK, P. (2010). Expression and function of p-glycoprotein in normal tissues : effect on pharmacokinetics. *Methods Mol Biol*, 596:199–222.
- STERN, L. (1921). Le liquide céphalo-rachidien au point de vue de ses rapports avec la circulation sanguine et avec les éléments nerveux de l'axe cérébro-spinal. . *Archives suisses de neurologie et de psychiatrie*, 8:215–232.
- STEVENSON, B. R., HEINTZELMAN, M. B., ANDERSON, J. M., CITI, S. et MOOSEKER, M. S. (1989). ZO-1 and cingulin : tight junction proteins with distinct identities and localizations. *Am J Physiol*, 257(4 Pt 1):C621–8.
- STEVENSON, B. R., SILICIANO, J. D., MOOSEKER, M. S. et GOODENOUGH, D. A. (1986). Identification of ZO-1 : a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*, 103(3):755–66.
- STEWART, P. A. et WILEY, M. J. (1981). Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells : a study using quail–chick transplantation chimeras. *Dev Biol*, 84(1):183–92.
- STINS, M. F., BADGER, J. et SIK KIM, K. (2001). Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog*, 30(1):19–28.
- STINS, M. F., PRASADARAO, N. V., ZHOU, J., ARDITI, M. et KIM, K. S. (1997). Bovine brain microvascular endothelial cells transfected with SV40-large T antigen : development of an immortalized cell line to study pathophysiology of CNS disease. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 33(4):243–7.
- SUGIYAMA, D., KUSUHARA, H., LEE, Y. J. et SUGIYAMA, Y. (2003). Involvement of multidrug resistance associated protein 1 (Mrp1) in the efflux transport of 17beta estradiol-D-17beta-glucuronide (E217betaG) across the blood-brain barrier. *Pharm Res*, 20(9):1394–400.
- SUMMERFIELD, S. G., READ, K., BEGLEY, D. J., OBRADOVIC, T., HIDALGO, I. J., COGGON, S., LEWIS, A. V., PORTER, R. A. et JEFFREY, P. (2007). Central nervous system drug disposition : the relationship between in situ brain permeability and brain free fraction. *J Pharmacol Exp Ther*, 322(1):205–13.

- SUMMERFIELD, S. G., STEVENS, A. J., CUTLER, L., del CARMEN OSUNA, M., HAMMOND, B., TANG, S. P., HERSEY, A., SPALDING, D. J. et JEFFREY, P. (2006). Improving the in vitro prediction of in vivo central nervous system penetration : integrating permeability, P-glycoprotein efflux, and free fractions in blood and brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 316(3):1282–90.
- SUN, D., LYTLE, C. et O'DONNELL, M. E. (1997). IL-6 secreted by astroglial cells regulates Na-K-Cl co-transport in brain microvessel endothelial cells. *Am J Physiol*, 272(6 Pt 1):C1829–35. 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- SUN, H., DAI, H., SHAIK, N. et ELMQUIST, W. F. (2003). Drug efflux transporters in the CNS. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(1):83–105.
- SUSSMAN, J., STOKOE, D., OSSINA, N. et SHTIVELMAN, E. (2001). Protein kinase B phosphorylates AHNAK and regulates its subcellular localization. *J Cell Biol*, 154(5):1019–30.
- TACHIKAWA, M., WATANABE, M., HORI, S., FUKAYA, M., OHTSUKI, S., ASASHIMA, T. et TERASAKI, T. (2005). Distinct spatio-temporal expression of ABCA and ABCG transporters in the developing and adult mouse brain. *J Neurochem*, 95(1):294–304.
- TAKASATO, Y., RAPOPORT, S. I. et SMITH, Q. R. (1984). An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am J Physiol*, 247(3 Pt 2):H484–93.
- TAKASHIMA, T., YOKOYAMA, C., MIZUMA, H., YAMANAKA, H., WADA, Y., ONOE, K., NAGATA, H., TAZAWA, S., DOI, H., TAKAHASHI, K., MORITA, M., KANAI, M., SHIBASAKI, M., KUSUHARA, H., SUGIYAMA, Y., ONOE, H. et WATANABE, Y. (2011). Developmental Changes in P-Glycoprotein Function in the Blood-Brain Barrier of Nonhuman Primates : PET Study with R-11C-Verapamil and 11C-Oseltamivir. *J Nucl Med*, 52(6):950–7. 1535-5667 (Electronic) 0161-5505 (Linking) Journal Article.
- TAKATA, F., DOHGU, S., YAMAUCHI, A., SUMI, N., NAKAGAWA, S., NAITO, M., TSURUO, T., SHUTO, H. et KATAOKA, Y. (2007). Inhibition of transforming growth factor-beta production in brain pericytes contributes to cyclosporin A-induced dysfunction of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol*, 27(3):317–28. 0272-4340 (Print) 0272-4340 (Linking) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- TAKEMOTO, H., KANEDA, K., HOSOKAWA, M., IDE, M. et FUKUSHIMA, H. (1994). Conditioned media of glial cell lines induce alkaline phosphatase activity in cultured artery endothelial cells. Identification of interleukin-6 as an induction factor. *FEBS Lett*, 350(1):99–103.
- TAMAI, I., SAI, Y., KOBAYASHI, H., KAMATA, M., WAKAMIYA, T. et TSUJI, A. (1997). Structure-internalization relationship for adsorptive-mediated endocytosis of basic peptides at the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther*, 280(1):410–5.
- TAO-CHENG, J. H. et BRIGHTMAN, M. W. (1988). Development of membrane interactions between brain endothelial cells and astrocytes in vitro. *Int J Dev Neurosci*, 6(1):25–37. 0736-5748 (Print) 0736-5748 (Linking) Journal Article.
- TATSUTA, T., NAITO, M., OH-HARA, T., SUGAWARA, I. et TSURUO, T. (1992). Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier. *J Biol Chem*, 267(28):20383–91.
- TAYLOR, C. J., NICOLA, P. A., WANG, S., BARRAND, M. A. et HLADKY, S. B. (2006). Transporters involved in regulation of intracellular pH in primary cultured rat brain endothelial cells. *J Physiol*, 576(Pt 3):769–85.
- TEIFEL, M. et FRIEDL, P. (1996). Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains. *Exp Cell Res*, 228(1):50–7.

- TERASAKI, T. et HOSOYA, K. (2001). Conditionally immortalized cell lines as a new in vitro model for the study of barrier functions. *Biol Pharm Bull*, 24(2):111–8.
- TERRY, S., NIE, M., MATTER, K. et BALDA, M. S. (2010). Rho signaling and tight junction functions. *Physiology (Bethesda)*, 25(1):16–26.
- THANABALASUNDARAM, G., EL-GINDI, J., LISCHPER, M. et GALLA, H. J. (2011a). Methods to assess pericyte-endothelial cell interactions in a coculture model. *Methods Mol Biol*, 686:379–99.
- THANABALASUNDARAM, G., PIEPER, C., LISCHPER, M. et GALLA, H. J. (2010). Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. *Brain Res*, 1347:1–10.
- THANABALASUNDARAM, G., SCHNEIDEWIND, J., PIEPER, C. et GALLA, H. J. (2011b). The impact of pericytes on the blood-brain barrier integrity depends critically on the pericyte differentiation stage. *Int J Biochem Cell Biol*, 43(9):1284–93.
- THOMAS, C. M. et SMART, E. J. (2008). Caveolae structure and function. *J Cell Mol Med*, 12(3):796–809.
- THOMAS, W. E. (1999). Brain macrophages : on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev*, 31(1):42–57.
- TILLING, T., KORTE, D., HOHEISEL, D. et GALLA, H. J. (1998). Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J Neurochem*, 71(3):1151–7.
- TILTON, R. G., MILLER, E. J., KILO, C. et WILLIAMSON, J. R. (1985). Pericyte form and distribution in rat retinal and uveal capillaries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26(1):68–73.
- TONTSCH, U. et BAUER, H. C. (1991). Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res*, 539(2):247–53.
- TOPAKIAN, R., BARRICK, T. R., HOWE, F. A. et MARKUS, H. S. (2010). Blood-brain barrier permeability is increased in normal-appearing white matter in patients with lacunar stroke and leucoaraiosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81(2):192–7.
- TRAN, N. D., CORREALE, J., SCHREIBER, S. S. et FISHER, M. (1999). Transforming growth factor-beta mediates astrocyte-specific regulation of brain endothelial anticoagulant factors. *Stroke*, 30(8):1671–8.
- TRAN, N. D., SCHREIBER, S. S. et FISHER, M. (1998). Astrocyte regulation of endothelial tissue plasminogen activator in a blood-brain barrier model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18(12):1316–24.
- TÓTH, A., VESZELKA, S., NAKAGAWA, S., NIWA, M. et DELI, M. A. (2011). Patented in vitro blood-brain barrier models in CNS drug discovery. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 6(2):107–18.
- TUSNADY, G. E., BAKOS, E., VARADI, A. et SARKADI, B. (1997). Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett*, 402(1):1–3.
- UCHIDA, Y., OHTSUKI, S., KATSUKURA, Y., IKEDA, C., SUZUKI, T., KAMIIE, J. et TERASAKI, T. (2011). Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem*, 117(2):333–45.
- UMEDA, K., MATSUI, T., NAKAYAMA, M., FURUSE, K., SASAKI, H., FURUSE, M. et TSUKITA, S. (2004). Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem*, 279(43):44785–94.

- Van der JAGT, K., MUNN, S., TORSLOV, J. et BRUINJN, J. (2004). Alternative approaches can reduce the use of test animals under REACH. JCR Report Addendum to Pedersen et al. 2003. *Addendum to the JRC report "Assessment of additional testing needs under REACH. Effects of (Q)SARS, risk based testing and voluntary industry initiatives"* (Pertersen et al., 2003).
- van VLIET, E. A., ZIBELL, G., PEKCEC, A., SCHLICHTIGER, J., EDELBROEK, P. M., HOLTMAN, L., ARO-NICA, E., GORTER, J. A. et POTSCHKA, H. (2010). COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats. *Neuropharmacology*, 58(2):404–12.
- VANGILDER, R. L., ROSEN, C. L., BARR, T. L. et HUBER, J. D. (2011). Targeting the neurovascular unit for treatment of neurological disorders. *Pharmacol Ther*, 130(3):239–47.
- VASILIOU, V., VASILIOU, K. et NEBERT, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*, 3(3):281–90.
- VAUTIER, S., LACOMBLEZ, L., CHACUN, H., PICARD, V., GIMENEZ, F., FARINOTTI, R. et FERNANDEZ, C. (2006). Interactions between the dopamine agonist, bromocriptine and the efflux protein, P-glycoprotein at the blood-brain barrier in the mouse. *Eur J Pharm Sci*, 27(2-3):167–74.
- VERBEEK, M. M., OTTE-HOLLER, I., FRANSEN, J. A. et de WAAL, R. M. (2002). Accumulation of the amyloid-beta precursor protein in multivesicular body-like organelles. *J Histochem Cytochem*, 50(5):681–90.
- VERBEEK, M. M., OTTE-HOLLER, I., WESSELING, P., RUITER, D. J. et de WAAL, R. M. (1994). Induction of alpha-smooth muscle actin expression in cultured human brain pericytes by transforming growth factor-beta 1. *Am J Pathol*, 144(2):372–82.
- VESTWEBER, D., WINDERLICH, M., CAGNA, G. et NOTTEBAUM, A. F. (2009). Cell adhesion dynamics at endothelial junctions : VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol*, 19(1):8–15.
- VESZELKA, S., PASZTOI, M., FARKAS, A. E., KRIZBAI, I., NGO, T. K., NIWA, M., ABRAHAM, C. S. et DELI, M. A. (2007). Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem Int*, 50(1):219–28.
- VIGNE, P., CHAMPIGNY, G., MARSAULT, R., BARBRY, P., FRELIN, C. et LAZDUNSKI, M. (1989). A new type of amiloride-sensitive cationic channel in endothelial cells of brain microvessels. *J Biol Chem*, 264(13):7663–8.
- VIRGINTINO, D., ROBERTSON, D., ERREDE, M., BENAGIANO, V., GIROLAMO, F., MAIORANO, E., RONCALI, L. et BERTOSSI, M. (2002). Expression of P-glycoprotein in human cerebral cortex microvessels. *J Histochem Cytochem*, 50(12):1671–6.
- VOINEA, M. et SIMIONESCU, M. (2002). Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs. *J Cell Mol Med*, 6(4):465–74.
- von TELL, D., ARMULIK, A. et BETSHOLTZ, C. (2006). Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res*, 312(5):623–9.
- WAGNER, C. C., BAUER, M., KARCH, R., FEURSTEIN, T., KOPP, S., CHIBA, P., KLETTER, K., LOSCHER, W., MULLER, M., ZEITLINGER, M. et LANGER, O. (2009). A pilot study to assess the efficacy of tariquidar to inhibit P-glycoprotein at the human blood-brain barrier with (R)-11C-verapamil and PET. *J Nucl Med*, 50(12):1954–61.
- WAKUI, S. (1988). Two- and three-dimensional ultrastructural observation of two cell angiogenesis in human granulation tissue. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 56(2):127–39.

- WAKUI, S., FURUSATO, M., MUTO, T., OHSHIGE, H., TAKAHASHI, H. et USHIGOME, S. (1997). Transforming growth factor-beta and urokinase plasminogen activator presents at endothelial cell-pericyte interdigitation in human granulation tissue. *Microvasc Res*, 54(3):262–9.
- WAKUI, S., FURUSATO, M., TANAKA, M., ALLSBROOK, W. C., J., KANO, Y. et USHIGOME, S. (1990). Endothelium and pericyte interdigitation : pathway for epidermal growth factor ? *Microvasc Res*, 40(2):285–91.
- WAKUI, S., YOKOO, K., MUTO, T., SUZUKI, Y., TAKAHASHI, H., FURUSATO, M., HANO, H., ENDOU, H. et KANAI, Y. (2006). Localization of Ang-1, -2, Tie-2, and VEGF expression at endothelial-pericyte interdigitation in rat angiogenesis. *Lab Invest*, 86(11):1172–84.
- WALSH, T. G., MURPHY, R. P., FITZPATRICK, P., ROCHFORD, K. D., GUINAN, A. F., MURPHY, A. et CUMMINS, P. M. (2011). Stabilization of Brain Microvascular Endothelial Barrier Function by Shear Stress Involves VE-cadherin Signaling Leading to Modulation of pTyr-Occludin Levels. *J Cell Physiol*.
- WAN, H., REHNGREN, M., GIORDANETTO, F., BERGSTROM, F. et TUNEK, A. (2007). High-throughput screening of drug-brain tissue binding and in silico prediction for assessment of central nervous system drug delivery. *J Med Chem*, 50(19):4606–15.
- WANG, Q., RAGER, J. D., WEINSTEIN, K., KARDOS, P. S., DOBSON, G. L., LI, J. et HIDALGO, I. J. (2005). Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Int J Pharm*, 288(2):349–59.
- WANG, Y. Y., LUI, P. C. et LI, J. Y. (2009). Receptor-mediated therapeutic transport across the blood-brain barrier. *Immunotherapy*, 1(6):983–93.
- WARDLAW, J. M. (2010). Blood-brain barrier and cerebral small vessel disease. *J Neurol Sci*, 299(1-2):66–71.
- WARREN, M. S., ZERANGUE, N., WOODFORD, K., ROBERTS, L. M., TATE, E. H., FENG, B., LI, C., FEUERSTEIN, T. J., GIBBS, J., SMITH, B., de MORAIS, S. M., DOWER, W. J. et KOLLER, K. J. (2009). Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. *Pharmacol Res*, 59(6):404–13.
- WEGENER, J., HAKVOORT, A. et GALLA, H. J. (2000). Barrier function of porcine choroid plexus epithelial cells is modulated by cAMP-dependent pathways in vitro. *Brain Res*, 853(1):115–24.
- WEIDENFELLER, C., SCHROT, S., ZOZULYA, A. et GALLA, H. J. (2005). Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone. *Brain Res*, 1053(1-2):162–74.
- WEIDENFELLER, C., SVENDSEN, C. N. et SHUSTA, E. V. (2007). Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *J Neurochem*, 101(2):555–65.
- WEKSLER, B. B., SUBILEAU, E. A., PERRIERE, N., CHARNEAU, P., HOLLOWAY, K., LEVEQUE, M., TRICOIRE-LEIGNEL, H., NICOTRA, A., BOURDOULOUS, S., TUROWSKI, P., MALE, D. K., ROUX, F., GREENWOOD, J., ROMERO, I. A. et COURAUD, P. O. (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *Faseb J*, 19(13):1872–4.
- WESTERGREN, I., NYSTROM, B., HAMBERGER, A. et JOHANSSON, B. B. (1995). Intracerebral dialysis and the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 64(1):229–34.
- WIJSMAN, J. A. et SHIVERS, R. R. (1998). Immortalized mouse brain endothelial cells are ultrastructurally similar to endothelial cells and respond to astrocyte-conditioned medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 34(10):777–84.

- WILHELM, I., FARKAS, A. E., NAGYOSZI, P., VARO, G., BALINT, Z., VEGH, G. A., COURAUD, P. O., ROMERO, I. A., WEKSLER, B. et KRIZBAI, I. A. (2007). Regulation of cerebral endothelial cell morphology by extracellular calcium. *Phys Med Biol*, 52(20):6261–74.
- WILHELM, I., NAGYOSZI, P., FARKAS, A. E., COURAUD, P. O., ROMERO, I. A., WEKSLER, B., FAZAKAS, C., DUNG, N. T., BOTTKA, S., BAUER, H., BAUER, H. C. et KRIZBAI, I. A. (2008). Hyperosmotic stress induces Axl activation and cleavage in cerebral endothelial cells. *J Neurochem*, 107(1):116–26.
- WILHELMUS, M. M., OTTE-HOLLER, I., van TRIEL, J. J., VEERHUIS, R., MAAT-SCHIEMAN, M. L., BU, G., de WAAL, R. M. et VERBEEK, M. M. (2007). Lipoprotein receptor-related protein-1 mediates amyloid-beta-mediated cell death of cerebrovascular cells. *Am J Pathol*, 171(6):1989–99.
- WOLBURG, H. et LIPPOLDT, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier : development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol*, 38(6):323–37.
- WOLBURG, H., NEUHAUS, J., KNIESEL, U., KRAUSS, B., SCHMID, E. M., OCALAN, M., FARRELL, C. et RISAU, W. (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci*, 107 (Pt 5):1347–57.
- WOLBURG, H., NOELL, S., MACK, A., WOLBURG-BUCHHOLZ, K. et FALLIER-BECKER, P. (2009). Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res*, 335(1):75–96.
- WOLFF, J. R. et BAR, T. (1972). 'Seamless' endothelia in brain capillaries during development of the rat's cerebral cortex. *Brain Res*, 41(1):17–24.
- WU, D. et PARDRIDGE, W. M. (1998). Pharmacokinetics and blood-brain barrier transport of an anti-transferrin receptor monoclonal antibody (OX26) in rats after chronic treatment with the antibody. *Drug Metab Dispos*, 26(9):937–9.
- XIAO, L., YANG, C., DOROVINI-ZIS, K., TANDON, N. N., ADES, E. W., LAL, A. A. et UDHAYAKUMAR, V. (1996). Plasmodium falciparum : involvement of additional receptors in the cytoadherence of infected erythrocytes to microvascular endothelial cells. *Exp Parasitol*, 84(1):42–55.
- XU, J., QU, Z. X., MOORE, S. A., HSU, C. Y. et HOGAN, E. L. (1992). Receptor-linked hydrolysis of phosphoinositides and production of prostacyclin in cerebral endothelial cells. *J Neurochem*, 58(5):1930–5.
- YAN, Q. et SAGE, E. H. (1998). Transforming growth factor-beta1 induces apoptotic cell death in cultured retinal endothelial cells but not pericytes : association with decreased expression of p21waf1/cip1. *J Cell Biochem*, 70(1):70–83. 0730-2312 (Print) 0730-2312 (Linking) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- YEMISCI, M., GURSOY-OZDEMIR, Y., VURAL, A., CAN, A., TOPALKARA, K. et DALKARA, T. (2009). Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med*, 15(9):1031–7.
- ZASTRE, J. A., CHAN, G. N., RONALDSON, P. T., RAMASWAMY, M., COURAUD, P. O., ROMERO, I. A., WEKSLER, B., BENDAYAN, M. et BENDAYAN, R. (2009). Up-regulation of P-glycoprotein by HIV protease inhibitors in a human brain microvessel endothelial cell line. *J Neurosci Res*, 87(4):1023–36.
- ZEHENDNER, C. M., LIBRIZZI, L., de CURTIS, M., KUHLMANN, C. R. et LUHMANN, H. J. (2011). Caspase-3 contributes to ZO-1 and Cl-5 tight-junction disruption in rapid anoxic neurovascular unit damage. *PLoS One*, 6(2):e16760.
- ZEHENDNER, C. M., LUHMANN, H. J. et KUHLMANN, C. R. (2009). Studying the neurovascular unit : an improved blood-brain barrier model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29(12):1879–84.

- ZELCER, N., van de WETERING, K., HILLEBRAND, M., SARTON, E., KUIL, A., WIELINGA, P. R., TEPHLY, T., DAHAN, A., BEIJNEN, J. H. et BORST, P. (2005). Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(20):7274–9.
- ZENKER, D., BEGLEY, D., BRATZKE, H., RUBSAMEN-WAIGMANN, H. et von BRIESEN, H. (2003). Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells. *J Physiol*, 551(Pt 3):1023–32.
- ZHANG, Y., HAN, H., ELMQUIST, W. F. et MILLER, D. W. (2000). Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells. *Brain Res*, 876(1-2):148–53.
- ZHANG, Y., WU, X., HE, Y., KASTIN, A. J., HSUCHOU, H., ROSENBLUM, C. I. et PAN, W. (2009). Melanocortin potentiates leptin-induced STAT3 signaling via MAPK pathway. *J Neurochem*, 110(1):390–9.
- ZHONG, Y., SAITOH, T., MINASE, T., SAWADA, N., ENOMOTO, K. et MORI, M. (1993). Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J Cell Biol*, 120(2):477–83.
- ZHONG, Y., SMART, E. J., WEKSLER, B., COURAUD, P. O., HENNIG, B. et TOBOREK, M. (2008). Caveolin-1 regulates human immunodeficiency virus-1 Tat-induced alterations of tight junction protein expression via modulation of the Ras signaling. *J Neurosci*, 28(31):7788–96.
- ZHOU, J., KONG, H., HUA, X., XIAO, M., DING, J. et HU, G. (2008). Altered blood-brain barrier integrity in adult aquaporin-4 knockout mice. *Neuroreport*, 19(1):1–5. 0959-4965 (Print) 0959-4965 (Linking) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- ZIMMERMANN, K. (1923). Der feinere bau der blutkapillaren. *Z Anat Entwicklungsgesch*, 68:29–109.
- ZIPSER, B. D., JOHANSON, C. E., GONZALEZ, L., BERZIN, T. M., TAVARES, R., HULETTE, C. M., VITEK, M. P., HOVANESIAN, V. et STOPA, E. G. (2007). Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 28(7):977–86.
- ZLOKOVIC, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2):178–201.
- ZLOKOVIC, B. V., DEANE, R., SAGARE, A. P., BELL, R. D. et WINKLER, E. A. (2010). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 : a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid beta-peptide elimination from the brain. *J Neurochem*, 115(5):1077–89.
- ZLOKOVIC, B. V., DEANE, R., SALLSTROM, J., CHOW, N. et MIANO, J. M. (2005). Neurovascular pathways and Alzheimer amyloid beta-peptide. *Brain Pathol*, 15(1):78–83. 1015-6305 (Print) 1015-6305 (Linking) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review.
- ZOZULYA, A., WEIDENFELLER, C. et GALLA, H. J. (2008). Pericyte-endothelial cell interaction increases MMP-9 secretion at the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res*, 1189:1–11.